



Voie de signalisation et gènes cibles de l'AMH dans le tractus génital femelle

Lauriane Sèdes

► To cite this version:

Lauriane Sèdes. Voie de signalisation et gènes cibles de l'AMH dans le tractus génital femelle. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T014 . tel-00989662

HAL Id: tel-00989662

<https://theses.hal.science/tel-00989662>

Submitted on 12 May 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS SUD
Ecole Doctorale ED419 BioSigne

Laboratoires :
INSERM U782, Clamart (octobre 2010-juillet 2012)
INSERM U1085, Rennes (juillet 2012-avril 2014)

Mention : Biologie

THESE DE DOCTORAT

soutenue le 3 avril 2014

par

Lauriane SÈDES

**Voie de signalisation et gènes cibles de l'AMH dans le
tractus génital femelle**

Directeur de Thèse:

Soazik JAMIN Chargée de Recherche, INSERM, Rennes

Composition du jury:

Rapporteurs:

Danielle MONNIAUX Directeur de Recherche, INRA, Nouzilly

Virginie ROUILLER-FABRE Professeur, Université Paris-Diderot

Examineurs:

Eric PAILHOUX Directeur de Recherche, INRA, Jouy-en-Josas

Nathalie DI CLEMENTE Directeur de Recherche, INSERM, Paris-Diderot

Gérard TACHDJIAN Professeur des universités-praticien hospitalier, Paris-sud

Remerciements

I- Introduction

Après avoir passé plus de trois ans sur mon sujet de thèse, il est l'heure pour moi de faire le bilan et de continuer mon chemin vers d'autres aventures. Il sera bien difficile de résumer tout ce que cette thèse m'a apporté tant sur le plan scientifique que personnel. C'est un parcours fait de grandes joies, de déceptions, le moral vacillant au gré des résultats. Quoi qu'il en soit, je sors grandie de cette expérience et je ne regrette à aucun moment d'avoir emprunté cette voie. Selon Isaac Asimov, la phrase la plus excitante que l'on puisse entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas « Eureka » mais c'est « drôle ». De très nombreuses fois au cours de ma thèse, c'est le mot que j'ai employé pour décrire mes résultats. Si j'en crois Mr Asimov, mes recherches sont peut-être les prémices d'une grande avancée scientifique, qui sait... Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ma future grande découverte.

Je vais commencer cette longue liste de remerciement par toi Soazik. Je tiens à te remercier pour tout ce que tu m'as apporté au cours de cette thèse. Merci pour tes conseils, ta rigueur scientifique, ton soutien et ta patience. Je tiens également à te dire merci pour ta qualité d'écoute et ta bonne humeur quotidienne qui m'ont permis de mener cette thèse dans un climat serein. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau...

Je tiens ensuite à remercier les membres du jury : Danielle Monniaux, Virginie Rouiller-Fabre, Nathalie di Clemente, Eric Pailhoux et Gérard Tachdjian. Merci de m'avoir accordé de votre temps pour évaluer mon travail de thèse.

II- Mes débuts de thèse à Paris

J'ai réalisé mon stage de master ainsi que la première moitié de ma thèse au sein de l'unité INSERM 782 à Clamart. Je remercie Jean-Yves Picard de m'avoir accueillie au sein de son unité et Nathalie di Clemente au sein de son équipe. J'ai fait mes premiers pas avec vous et je vous remercie de m'avoir soutenue. Merci également à Nathalie Josso qui a su partager son expérience et sa passion pour l'AMH.

Je tiens à remercier tous mes collègues de l'équipe de Clamart :

Fabrice : merci pour tes encouragements et ton soutien. Nos longues discussions m'ont permis de progresser et d'affûter mon esprit scientifique.

Arnaud : alias « mister génotypage », merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Dominique : merci beaucoup pour ton soutien et ta joie de vivre.

Nassimus Arouchi : Il n'y a qu'un énergumène comme toi, merci pour tout. Je te connais en tant qu'ami, j'ai hâte de te découvrir dans ton rôle de papa...

Alice : Merci « miss BMPs » pour tes conseils et ta gentillesse. Je te souhaite un avenir aux pays des merveilles...

Françoise : Ma Françoise, merci d'avoir été là dans les moments de doute. Je vais bientôt avoir besoin de toi pour que tu me guides...

Un grand merci à Didier, qui murmure à l'oreille des souris, je regrette nos discussions littéraires à l'animalerie.

Merci également à Aurélie, Perrine, Maëliiss et Hadia, travailler avec vous a été un plaisir.

III- A la conquête de l'ouest...

En juillet 2012, j'ai quitté la région parisienne pour me retrouver, m'avait-on dit, dans un pays humide où les allergiques à la farine de blé noir n'ont pas leur place (pour toi ma Dédé), où des oiseaux bruyants appelés mouettes remplacent nos chers pigeons estropiés (pour toi ma Céline) et où les vêtements les plus portés sont la marinière et le ciré jaune, bref un pays étrange... Au bout de quelques mois, j'ai aimé la pluie, les galettes, les mouettes et même le ciré jaune. La Bretagne, ça vous gagne...

Cela fait plus d'un an et demi que je travaille au sein de l'unité INSERM 1085 (IRSET) à Rennes et je tiens à remercier le directeur de l'unité, Bernard Jégou, pour son accueil chaleureux. Je remercie également Michael Primig de m'avoir intégré à son équipe et de s'être intéressé à l'avancement de mes travaux bien que ne travaillant pas sur la même thématique.

Je tiens également à remercier les membres de mon équipe, Christine K, Fatima et Aurore. Merci pour vos conseils et votre soutien. Un merci tout particulier à Igor qui m'a fait découvrir son travail sur la levure à travers l'étude de la fermentation de la bière. C'est aussi ça la science...

Sans oublier, un grand merci à tous mes collègues Rennais :

Anna : merci pour tous tes précieux conseils manips, ton soutien anti coups de blues, ta bonne humeur et ta gentillesse. Reviens vite au bureau, on a laissé le chauffage allumé pour toi...

Fred : alias « O-Geek-One-Kenobite », mon maître en bioinformatique tu es ! Merci d'avoir rendu ma relation avec mon ordinateur plus amicale. Merci pour ton aide, ton caractère de bisounours et tes blagues nulles mais tellement drôles. J'attends la prochaine séance ciné avec impatience.

Antoine : merci toto pour nos franches rigolades intra et extra laboratoire. Même si tu perds souvent la « boule », tu finis toujours par la retrouver avec un peu d'aide... On fera je l'espère un dernier « mardi, c'est pourri » à l'Amaryllis. Je n'ai qu'un mot pour conclure YEP !

Bertrand : merci monsieur Affymetrix pour ton aide technique, tes conseils et ta gentillesse.

Séverine : Merci pour tes conseils et pour m'avoir fait partager ton savoir encyclopédique sur l'AMH, que dis-je sur l'ovaire en général...

Emmanuelle : Merci pour ta gentillesse, ton humour et nos petites discussions matinales autour d'un petit Clooney forte ou decaféinato...

Giulia : alias « stupida Giulia », tes petites colères contre ton ordinateur vont me manquer.

Je tiens également à remercier Océane (petit caribou), Maniana, Aurélie, Dominique (what else?), Florence, Anne-Pascale, Christèle, Isa et lolo. Merci à vous pour votre accueil et votre sympathie. Un laboratoire n'est rien sans des supers secrétaires Cath (merci pour ton grain de folie) et Véro (on repart en vacances quand tu veux). Merci pour votre disponibilité, votre efficacité légendaire et votre gentillesse.

IV- La thèse, c'est des amis

Alex : Tu as été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments et nos discussions me manquent. Qu'est-ce qu'on a ri... La prochaine fois qu'on se voit on écoute un album de Mylène et on regarde un spectacle de Muriel. Toi aussi tu tiens le bon bout, c'est bientôt la fin, courage chouchou.

Je voudrai dire un grand merci à mes mouffettes, on en aura vécu des choses ensemble... Plus que des collègues vous êtes devenues des amies. Nos chemins vont bientôt se séparer et vous allez beaucoup me manquer (séquence « sortez vos mouchoirs ») :

Clém : alias « l'agent Chalmed », merci ma copine d'ovaire pour nos discussions scientifiques et moins scientifiques et pour nos nuits « mise en page », ma thèse n'aurait pas été la même sans toi. Toi qui adore les mots compliqués, j'ai trouvé une phrase juste pour toi : une diatribe dithyrambique proche de la cacostomie, déconseillée aux apopathodiaphulatophobes (je veux la traduction demain sur mon bureau).

Céline : mon petit poney, merci pour ta bonne humeur à toute épreuve même les jours où tu arrives en mode « cousin-machin ». Merci pour nos fous rires post engloutissement de bonbons. Sous tes airs de « tu me touches, je te bouffe », j'ai pu découvrir une nana topissime, super géniale. Tu es la prochaine sur la liste et j'espère être là pour te voir devenir docteur.

Millissia : alias « mamouche », merci à la plus jolie des geishas pour tout ce que tu m'a apporté. Tu es la reine incontestée du sarcasme avec un cœur gros comme ça... Ce qui va me manquer par-dessus tout, ce sont tes imitations de Gonzague... J'en pleure de rire rien que d'y repenser. Je te souhaite beaucoup de courage pour la fin de cette épreuve qu'est la thèse et juste au passage, j'ai une adresse de coiffeur pour toi. Il paraît que l'actuel ne coupe pas droit.

Audrey : alias « Dédé la dév... », merci à la championne du monde de l'immunohistochimie. C'est grâce à toi que mes coupes sont si belles et mes manips si réussies. J'ai trouvé en toi une petite sœur de cœur et la vie au labo n'a plus été la même après ton départ. Je crois que je peux dire au nom de tout le monde (ou presque) que tu nous manques. Si tu pouvais m'envoyer par texto, de temps en temps, un mot qui n'existe pas dans la langue française, ça me ferait du bien. Allez juste un petit « grisonâtre » ou une petite « gigottière »...

J'ai la chance d'avoir des amis géniaux qui m'entourent et me soutiennent. Leslie, ma coupine, un grand merci à toi pour tout ce que tu m'apportes. Je sais que tu seras toujours là pour moi et j'espère que nos chemins se rapprocheront très bientôt. Merci pour nos vacances, nos nuits blanches à discuter, nos fous rires, tes conseils,... bref, merci d'être toi. Merci Stan de prendre soin de ma copine et j'ai juste un petit conseil d'ami, les cacahuètes (les vraies) ne se mangent pas avec la coque...

Merci Tommy pour m'avoir fait vivre tes aventures... Hissez haut matelot !

Merci à toi mon Nico, même si on se voit moins, j'ai toujours une petite pensée pour toi.

Ma Sisi, merci pour tous ces moments passés ensemble et ceux à venir.

Merci également à mon lapin crétin Robin, à mon portugais préféré Cristo et à tous ceux que j'aurais oublié au passage...

V- La thèse c'est aussi la famille

Je tiens à adresser un merci tout particulier à mes parents, ma sœur et ma grand-mère qui ont toujours été là pour moi. Vous m'avez soutenue, vous avez toujours cru en moi. Vous m'avez supporté (dans tous les sens du terme) pendant toutes ces longues années d'études. Je n'y serais jamais arrivée sans vous. J'espère qu'aujourd'hui vous êtes fiers de moi car si j'en suis là, c'est grâce à vous. Je vous aime.

Merci à toute ma famille perpignanaise qui ne survivrait pas au climat breton. Même si on ne se voit pas souvent, je pense à vous.

Je finis ces remerciements par toi Sylvain. J'ai commencé ma thèse, tu étais là et je la finis, tu es toujours là, bravo ! Merci pour ton soutien de tous les jours, pour m'avoir suivi au pays de la galette-saucisse (je sais que tu l'affectionnes particulièrement), et pour supporter mes angoisses et mon stress depuis bientôt 4 ans. Je sais que je peux compter sur toi quoi qu'il advienne et j'espère que tu seras là pour les prochaines étapes de ma vie. Encore une petite chose, la soutenance est proche et je pense que tu vas devoir gérer mes crises de paniques, merci par avance pour ta patience et ta zen-attitude.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	7
Liste des figures et des tableaux	11
Avant-Propos.....	15
Introduction.....	17
I La différenciation sexuelle	19
1 Le stade indifférencié	19
1.1 La gonade indifférenciée	20
1.2 Le tractus génital indifférencié.....	25
2 La différenciation sexuelle de la gonade et du tractus génital.....	26
2.1 La différenciation de la gonade.....	26
2.2 La différenciation du tractus génital	29
3 Régulation génétique de la différenciation sexuelle chez les mammifères	33
II La folliculogenèse	34
1 Introduction	34
2 Evolution morphologique et moléculaire des follicules	35
2.1 Le follicule primordial	35
2.2 Le follicule primaire.....	37
2.3 Le follicule secondaire	38
2.4 Le follicule antral	38
2.5 Le follicule mûr (de Graff).....	40
3 Maturation folliculaire	40
3.1 La croissance folliculaire basale	41
3.2 La croissance folliculaire terminale	43
4 La synthèse des hormones stéroïdes dans l’ovaire adulte	47

4.1	Collaboration entre cellules de la granulosa et cellules de la thèque	49
4.2	Stéroïdogénèse dans le corps jaune	51
4.3	Régulation de la stéroïdogénèse	51
5	L'axe hypothalamo-hypophysaire : régulation de la fonction endocrine ovarienne	53
5.1	Phase préovulatoire	53
5.2	Phase périovulatoire	55
5.3	Phase postovulatoire.....	55
III	Le cycle utérin	57
1	Morphologie	57
2	Modification au cours du cycle	57
IV	Les membres de la famille du TGF- β	61
1	Voie de signalisation générale des membres de la famille du TGF- β	61
1.1	Les corécepteurs ou récepteurs de type III.....	63
1.2	Les récepteurs.....	69
1.3	Les protéines Smad	71
1.4	Voie de signalisation : Résumé	79
2	Rôles des membres de la famille du TGF- β dans la fonction reproductrice ..	79
2.1	Rôles des ligands de la famille du TGF- β sur les CGP.....	79
2.2	Voie de signalisation du TGF- β : rôles sur les CGP	81
2.3	Autres rôles au cours du développement	85
2.4	Sur la folliculogénèse	85
2.5	Sur la fonction utérine	91
V	L'hormone anti-Müllérienne	92
1	Historique	92
2	Le gène de l'AMH	95
3	La protéine	95
VI	Expression et régulation de l'AMH	97
1	Expression	97
1.1	Chez le mâle	97
1.2	Chez la femelle.....	99

2	Régulation de l'expression de l' <i>Amh</i>	100
2.1	Chez le mâle	100
2.2	Chez la femelle.....	105
VII	Rôles physiologiques de l'AMH	107
1	Chez le mâle	107
2	Chez la femelle	109
3	L'AMH en clinique chez la femme	111
3.1	Procréation médicalement assistée.....	111
3.2	AMH et cancer	112
3.3	Le syndrome des ovaires polykystiques.....	113
VIII	Gènes cibles de l'AMH	116
1	Dans le testicule.....	116
2	Dans l'ovaire.....	117
3	Dans les autres organes.....	117
IX	Voies de signalisation de l'AMH	118
1	Recepteur de type II de l'AMH : AMHR-II.....	118
1.1	Gène et protéine	118
1.2	Expression	119
1.3	Régulation	119
2	Recepteurs de type I et protéines Smad.....	120
2.1	Dans le canal de Müller.....	120
2.2	Dans le testicule	121
2.3	Dans l'ovaire	123
2.4	Dans les autres organes	125
X	Voies de signalisation alternatives de l'AMH.....	125
1.1	La voie des Wnt	125
1.2	La voie NF-kB.....	129
XI	Objectifs de ce travail.....	133
	Matériels et Méthodes	135
I	Réactifs.....	137

II	Modèles	137
1	Souris	137
1.1	Euthanasie	139
1.2	Dissection	139
1.3	Génotypage	139
2	Cellules de la granulosa murine.....	141
2.1	Culture primaire	141
2.2	Lignée cellulaire AT29C-U493.....	141
3	Utérus murin	143
III	Immunocytofluorescence	143
IV	Immunohistochimie.....	145
1	Préparation des échantillons	145
2	Marquage	145
V	Transfections	147
1	Ensemencement	147
2	Transfection transitoire d'ADN plasmidique	147
2.1	Principe	147
2.2	Protocole	149
VI	Extraction d'ARN, RT, PCR, q-PCR.....	153
1	Extraction des ARN totaux.....	153
2	Synthèse d'ADN complémentaire : transcription inverse (RT)	153
3	PCR.....	153
4	PCR en temps réel (q-PCR).....	155
5	Macro-array (RT ² Profiler PCR array)	155
5.1	Principe	155
5.2	Protocole	157
VII	Analyse protéique	157
1	Extraction.....	157
2	Dosage protéique	158
3	Western Blot	158

VIII	Puces à ADN (micro-array)	159
1	Principe	159
2	Echantillons	159
2.1	Transcriptomes ovaires WT et KO <i>Amh</i>	159
2.2	Transcriptome des CG contrôles et des CG exposées à de l'AMH	159
3	Protocole	161
3.1	Analyse des ARN	161
3.2	Préparation des échantillons	161
3.3	Déroulement de l'expérience	161
3.4	Analyse bioinformatique des données	164
	Résultats.....	167
I	Voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa immatures ..	169
1	Synthèse de l'article.....	169
1.1	Introduction	169
1.2	Matériels et Méthodes	170
1.3	Résultats	171
1.4	Conclusion.....	173
2	Publication	173
3	Résultats supplémentaires : voies alternatives de l'AMH	175
3.1	Introduction	175
3.2	Matériels et méthodes	176
3.3	Résultats	176
3.4	Discussion	177
II	Gènes cibles de l'AMH dans les cellules de la granulosa immatures	183
1	Introduction	183
2	Matériels et Méthodes	183
2.1	Puce à ADN (Micro-array) : protocole	183
3	Résultats.....	185
3.1	Ovaires contrôles (WT) versus ovaires déficients en AMH (KO <i>Amh</i>)...	185
3.2	Cellules de la granulosa exposées à l'AMH : Analyse des données brutes	189

4	Discussion.....	191
4.1	Ovaire WT vs ovaire KO AMH.....	191
4.2	CG exposées à l'AMH.....	195
III	Expression et rôle de l'AMH dans l'utérus.....	211
1	Introduction.....	211
2	Matériels et Méthodes.....	211
3	Résultats.....	212
3.1	Expression de l'AMH dans l'utérus.....	212
3.2	Gènes dérégulés dans l'utérus KO <i>Amh</i>	213
4	Discussion.....	214
	Discussion générale et perspectives	225
I	Problématique.....	226
II	Voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa.....	227
1	Récepteur de type I.....	228
2	Les protéines Smad.....	229
3	Les co-récepteurs.....	229
4	Voies alternatives.....	230
III	Gènes cibles de l'AMH dans les CG.....	231
1	Résultats et perspectives.....	232
2	Critique du choix de l'échantillonnage.....	232
2.1	Ovaire WT vs Ovaire KO <i>Amh</i>	233
2.2	CG exposées à l'AMH : critique de la dose.....	233
2.3	Transcriptome des cellules de la granulosa.....	234
IV	AMH et physiologie utérine.....	236
1	Chez l'Homme.....	236
2	Chez la souris.....	236
	Conclusion	239
	Annexes	243
	Références Bibliographiques	247

Liste des abréviations

µg : micro-gramme

µl : micro-litre

β-ME : beta-mercaptoéthanol

3β-HSD : 3beta-hydroxysteroid-deshydrogenase

17β-HSD : 17beta-hydroxysteroid-deshydrogenase

A

ActR-IA : Récepteur de type I A de l'activine (ALK2)

ActR-II(B) : Récepteur de type II (B) de l'activine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ALK: Activin like kinase

AMH : Anti-Müllerian Hormone/Hormone anti-müllérienne

AMH-PC: AMH digérée par la plasmine

AMHR-II (Amhr2) : Récepteur de type II de l'AMH

AMP : Assistance Médicale à la Procréation

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN: Acide ribonucléique

B

BET : Bromure d'éthidium

BMP: Bone Morphogenetic protein

BMPR-IA : Bone Morphogenetic protein récepteur de type I (ALK3)

BMPR-IB : Bone Morphogenetic protein récepteur de type I (ALK6)

C

CDK : Cyclin dependant kinase

CG : Cellules de la granulosa en culture primaire

CGP : Cellules germinales primordiales

CGT : Cellules de la granulosa tumorales

cKO : Souris Knock-Out conditionnelle

CM : Canal de Müller

CW : Canal de Wolff

CYP11A1 : Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (P450scc)

CYP19A1 : Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (P450aro, aromatase)

D

DAX1 : dosage-sensitive sex reversal, on chromosome X, gene 1

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

E

Emx2 : Empty spiracles homeobox 2

F

FOXL2 : Forkhead box L2

FSH : Follicle Stimulating Hormone

FSHR : Follicle Stimulating Hormone Receptor

G

GATA4 : GATA binding protein 4

GDF9 : Growth differentiation factor 9

GFP : Green fluorescent protein

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

Gro-β : Growth Regulated Protein beta (CXCL2)

H

HSD3B : Hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase and delta isomerase

I

IEX1 : immediate early response gene X-1

IGF : Insulin-like growth factor

IκB : Inhibitor of kappa B

J

jpc : jour post-coïtum

jpn : jour post-natal

K

KO : Souris Knock-Out

KO *Amh* : Souris invalidées pour le gène de l'*Amh*

L

LH : Luteinizing hormone

LHR (*Lhcgr*) : Luteinizing hormone (choriogonadotropin) receptor

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

min : minute

MIS: Müllerian-inhibiting substance (AMH)

mM : millimolaire

N

NFkB : Nuclear factor kappa b

ng : nanogramme

nm : nanomètre

O

OPK : ovaire polykystique

OVGP1 : Oviductal glycoprotein 1

P

P450scc : P450 cholesterol side chain clivage

Pb : paire de base

PBS : Phosphate buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFA: paraformaldéhyde

PI3K : Phosphatidyl-inositol 3 kinase

PKA : Protein kinase A

PMA : Procréation Médicalement Assistée

PMDS : Persistent Müllerian duct syndrome (Syndrome de persistance des canaux de Müller)

Q

q-PCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

S

SBE : Smad binding element

sec : seconde

Sem : semaine

SF1 : Steroidogenic factor 1

siRNA : silencing ribonucleic acid

SOPK : Syndrome des ovaires polykystiques

SOX : SRY-related HMG protein

SRY : Sex determining region on Y

StAR : Steroidogenic acute regulatory protein

STRA8 : Stimulated by retinoic acid gene 8

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TBS : Tris buffer saline

TGF- β : Transforming Growth factor beta

W

WNT : Wingless integrated

WT : Wild type (souris contrôle, non génétiquement modifiées)

WT1 : Wilm's tumor associated gene

Liste des figures et des tableaux

Figures

	INTRODUCTION	page
Figure 1 :	Structure du système urogénital indifférencié de la souris à 10,5 jpc	20
Figure 2 :	Spécification et migration des cellules germinales primordiales	22
Figure 3 :	Développement des canaux de Müller en trois phases	24
Figure 4 :	Les expériences de Jost (1947-1953)	30
Figure 5 :	Différenciation sexuelle du tractus génital	30
Figure 6 :	La détermination sexuelle chez la souris	32
Figure 7 :	Les différents stades folliculaires	36
Figure 8 :	Durée du recrutement et de la sélection folliculaire chez la femme et la ratte	42
Figure 9 :	Contrôle de la reprise de la méiose pré-ovulatoire	44
Figure 10 :	Biosynthèse des stéroïdes dans l'ovaire	48
Figure 11 :	L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique	52
Figure 12 :	Histologie de l'utérus murin	56
Figure 13 :	Régulation de la fonction utérine par les hormones ovariennes	56
Figure 14 :	Les sous-classes de la superfamille du TGF- β	60
Figure 15 :	Les récepteurs de la famille du TGF- β	72
Figure 16 :	Structure des différents types de protéines Smad	74
Figure 17 :	Voie de signalisation canonique des membres de la famille du TGF- β	78
Figure 18 :	Les Smad au coeur d'autres voies de signalisation	80
Figure 19 :	Structures des inhibines et activines	88
Figure 20 :	Expression des inhibines et activines au cours de la folliculogénèse	90
Figure 21 :	Modèle de formation du complexe AMH-AMHR-II	96
Figure 22 :	Variations des taux sérique d'AMH chez l'Homme	98
Figure 23 :	Régulation directe de l'expression de l'AMH	102
Figure 24 :	Rôle de l'AMH dans la folliculogénèse	110
Figure 25 :	Syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)	114
Figure 26 :	Voie de signalisation canonique des WNT	124
Figure 27 :	Modèle de régression des canaux de Müller au cours de la différenciation sexuelle mâle	126
Figure 28 :	Voie de signalisation canonique NFkB	130

MATERIELS ET METHODES

Figure 29 :	Génération des souris cKO <i>Acvr1</i> et <i>Bmpr1a</i>	136
Figure 30 :	L'appareil reproducteur femelle	138
Figure 31 :	Culture primaire de cellules de la granulosa murine	140
Figure 32 :	Principe de la technique des gènes rapporteurs Smad-Gal4/UAS-luciférase	146
Figure 33 :	Principe de la technique des gènes rapporteurs TOPflash et pNFkB-luc	148
Figure 34 :	Principe de la q-PCR Taqman	154
Figure 35 :	Protocole du Macro-array (RT ² profiler PCR array)	156

Figure 36 :	Contrôle des ARN sur puce agilent	160
Figure 37 :	Protocole du micro-array	162

RESULTATS

Figure 38 :	Voies de signalisation alternatives de l'AMH dans les cellules de la granulosa	179
Figure 39 :	Voies alternatives de l'AMH dans les CG : technique de gènes rapporteurs	180
Figure 40 :	<i>Iex1</i> n'est pas régulé par l'AMH	181
Figure 41 :	Stratégie de filtration des données	199
Figure 42 :	Expression différentielle des transcrits dans l'ovaire WT et KO <i>Amh</i>	200
Figure 43 :	Gènes différentiellement régulés entre l'ovaire WT et l'ovaire KO <i>Amh</i>	201
Figure 44 :	Validation des résultats par q-PCR	202
Figure 45 :	Localisation de la protéine OVGP1 dans l'ovaire de 3 semaines par immunohistochimie	203
Figure 46 :	Localisation de la protéine OVGP1 dans l'ovaire de 8 semaines par immunohistochimie	204
Figure 47 :	Expression de la protéine OVGP1 dans les cellules de la granulosa (CG)	206
Figure 48 :	Régulation de l'expression des gènes <i>Ovpg1</i> et <i>Kcnj2</i> par les Smad : Recherche de Smad Binding Element (SBE)	207
Figure 49 :	Stratégie de filtration des données	208
Figure 50 :	Expression différentielle des transcrits après une exposition de 6 h ou de 24 h à l'AMH	209
Figure 51 :	Gènes différentiellement régulés après une exposition de 6 h ou de 24 h à l'AMH	210
Figure 52 :	Expression de l' <i>Amh</i> dans l'utérus	217
Figure 53 :	Expression de l'AMH dans l'ovaire et l'oviducte de 3 semaines par immunofluorescence	218
Figure 54 :	Expression de l'AMH dans l'utérus de 8 semaines à 0,5 jpc par immunofluorescence	219
Figure 55 :	Résultats du PCR-array (macro-array): comparaison entre utéri WT et KO <i>Amh</i> de 8 semaines à 0,5 jpc	221
Figure 56 :	Validation des résultats par q-PCR	222
Figure 57 :	Expression de <i>Junb</i> dans l'utérus gravide	223

CONCLUSION

Figure 58 :	Voie de signalisation canonique de l'AMH dans les cellules de la granulosa immatures	240
-------------	--	-----

ANNEXES

Figure 59 :	Stratégie de filtration des données	244
Figure 60 :	Enrichissements fonctionnels dans les CG	245
Figure 61 :	Expression différentielle des transcrits entre l'ovaire WT et les CG isolées	246

Tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1 :	Chronologie de la différenciation des gonades	18
Tableau 2 :	Chronologie de la différenciation du tractus génital	18
Tableau 3 :	Les corécepteurs de la famille du TGF- β	62
Tableau 4 :	Nomenclature des récepteurs de type I de la famille du TGF- β	70
Tableau 5 :	Les différentes lignées KO des ligands de la famille du TGF- β : Rôles dans la fonction reproductive femelle	82

Tableau 6 :	Les différentes lignées KO des acteurs de la voie de signalisation de la famille du TGF- β : Rôles dans la fonction reproductive femelle	84
-------------	--	----

MATERIELS ET METHODES

Tableau 7 :	Amorces utilisées pour le génotypage des souris mutantes	139
Tableau 8 :	Programmes du Citadel utilisés en fonction des échantillons à inclure	144
Tableau 9 :	Programme du Varistain utilisé pour réhydrater les échantillons	144
Tableau 10 :	Amorces et sondes utilisées en PCR et en q-PCR	152

RESULTATS

Tableau 11 :	Synthèse de l'expression de la protéine OVGP1 dans les différentes cellules folliculaires	205
--------------	---	-----

Avant-Propos

La fonction de reproduction est décrite comme assurant la pérennité de l'espèce, par opposition à la fonction de nutrition, par exemple, qui assure la pérennité de l'individu. Dans un monde où l'infertilité augmente, l'étude de la reproduction prend de l'importance dans le domaine de la santé publique puisque environ 15% des couples consultent un médecin au moins une fois pour un problème d'infertilité. Dans 33% des cas la cause de l'infertilité est purement féminine. Les troubles de l'ovulation sont la cause la plus commune de l'infertilité féminine. L'ovulation peut être totalement absente (anovulation) ou présente mais de mauvaise qualité (dysovulation). En absence d'ovulation, la fécondation et la grossesse ne peuvent avoir lieu. La folliculogénèse et l'ovogénèse sont deux fonctions ovariennes étroitement liées permettant de donner naissance à un ovocyte capable d'être fécondé. Ces deux fonctions sont très finement régulées par de nombreux facteurs.

L'hormone anti-Müllérienne (AMH) participe au bon déroulement et à la régulation de ces fonctions. Elle est essentiellement produite par les cellules de la granulosa et exerce une régulation négative sur la folliculogénèse. C'est à l'heure actuelle un marqueur très utilisé en clinique pour mesurer la réserve ovarienne et évaluer la réussite des stimulations ovariennes dans le cas de la procréation médicalement assistée. C'est également un marqueur du cancer des cellules de la granulosa et de ses récives.

Bien que l'expression de l'AMH soit primordiale pour une fonction ovarienne normale, les rôles précis et le mode d'action de cette hormone sont actuellement peu décrits. Nous avons choisi d'étudier, dans un premier temps, la voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa murines. Par différentes approches, j'ai pu mettre en évidence au cours de ma thèse que l'AMH transduisait son signal via le récepteur BMPR-IA et les Smad1/5 dans ce type cellulaire. Dans le but de mieux comprendre les rôles de l'AMH dans l'ovaire, je me suis également intéressée aux gènes cibles de cette hormone. Par une approche globale basée sur les puces à ADN Affymetrix, j'ai pu déterminer de nouveaux gènes cibles de l'AMH permettant ainsi d'élargir les potentiels rôles de cette hormone en reproduction. Enfin, chez la souris, le récepteur de l'AMH a été mis en évidence au niveau du myomètre

utérin laissant présager une fonction potentielle de l'AMH sur cet organe. J'ai donc entrepris d'étudier l'expression de cette hormone dans l'utérus. J'ai également cherché à définir un rôle de l'AMH en étudiant la dérégulation de certains gènes des voies BMP/activine/TGF- β par cette hormone dans l'utérus. Bien que préliminaires, ces résultats semblent indiquer que l'AMH pourrait jouer un rôle direct ou non sur la fonction utérine.

La maîtrise des connaissances sur la régulation des fonctions ovariennes et utérines est indispensable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la reproduction. A terme, l'étude des dysfonctionnements ovariens ou utérins chez la femme pourra permettre une meilleure prise en charge thérapeutique dans les cas de procréation médicalement assistée ou de grossesses à risque.

Introduction

Principaux événements	Stade de développement (jpc, jpn, sem)*			
Mâles (M) et Femelles (F)	souris	rat	bovin	humain
Migration des cellules germinales dans la crête génitale (M et F)	10-11 jpc	11-12 jpc	30-35 jpc	4-5 sem
Différenciation des cordons séminifères (M)	12 jpc	14 jpc	40 jpc	7 sem
Différenciation des cellules de Leydig (M)	13 jpc	15 jpc	45 jpc	8 sem
Début de la prophase méiotique (F)	13-14 jpc	17 jpc	70 jpc	9 sem
Début de la folliculogénèse (F)	3 jpn	1-2 jpn	90 jpc	14 sem

Tableau 1 : Chronologie de la différenciation des gonades: Ce tableau présente les étapes clés de la différenciation des gonades chez différentes espèces: la souris, le rat, le bovin et l'humain. (Magre and Vigier 2006). *(jpc = jour post coïtum, jpn = jour post-natal, sem = semaines post conception)

Principaux événements	Stade de développement (jpc, sem)*			
Fœtus Mâle (M) et femelle (F)	Souris	Rat	Bovin	Humain
Régression des canaux de Müller (M)	14 jpc	14.5 jpc	50 jpc	8 sem
Masculinisation des organes génitaux externes, distance ano-génitale augmentée (M)	16 jpc	18.5 jpc	47 jpc	9-10 sem
Vésicules séminales (M)	16 jpc	17.5 jpc	56 jpc	
Bourgeons prostatiques (M)	17 jpc	18.5 jpc	56 jpc	10 sem
Régression des canaux de Wolff (F)	15 jpc	17.5 jpc	70 jpc	10 sem
Fin de la migration testiculaire: (M)				
Intra-abdominale			105 jpc	12 sem
Intra-scrotale	18 jpc	20 jpc	140 jpc	28 sem

Tableau 2 : Chronologie de la différenciation du tractus génital: Ce tableau présente les étapes clés de la différenciation du tractus génital chez différentes espèces: la souris, le rat, le bovin et l'humain (Magre and Vigier 2006). *(jpc = jour post coïtum, sem = semaines post conception)

I La différenciation sexuelle

La différenciation sexuelle est un processus qui débute pendant la période fœtale et se poursuit en période néonatale et pubertaire pour aboutir à l'établissement d'un dimorphisme sexuel. Le sexe génétique d'un individu est déterminé dès la fécondation et dépend de la nature des chromosomes sexuels. Cependant, quel que soit son patrimoine chromosomique, chaque individu va passer par un phénotype sexuellement indifférencié au cours de la vie fœtale. La mise en place du sexe est un phénomène complexe déterminé par l'expression différentielle de certains gènes chez le mâle et chez la femelle et seront détaillés par la suite. Les grandes étapes développementales permettant d'aboutir à la différenciation sexuelle mâle ou femelle sont très proches chez les mammifères et sont exposées dans les tableaux 1 et 2.

1 Le stade indifférencié

Le développement de l'appareil urogénital (comprenant les reins, les gonades, la vessie et les conduits urinaires et reproducteurs) chez les vertébrés commence peu après la gastrulation par la différenciation du mésoderme intermédiaire. Cette structure va, dans un premier temps, proliférer puis certaines cellules vont subir une transition de cellules mésenchymateuses à cellules épithéliales pour former les futures structures reproductrices mâles et femelles (Kobayashi and Behringer 2003).

Chez la souris, la crête génitale est visible à environ 10 jours post-coïtum (jpc) comme un épaississement de la paroi interne du mésonéphros (figure 1). C'est la colonisation de la crête génitale par les cellules germinales primordiales (CGP), entre 10,5 et 11,5 jpc, qui permettra aux gonades définitives et sexuellement différenciées de se développer.

L'étude du phénotype de souris invalidées ou génétiquement modifiées pour certains gènes importants dans la fonction reproductrice a permis de mieux comprendre le développement gonadique et la mise en place du tractus génital.

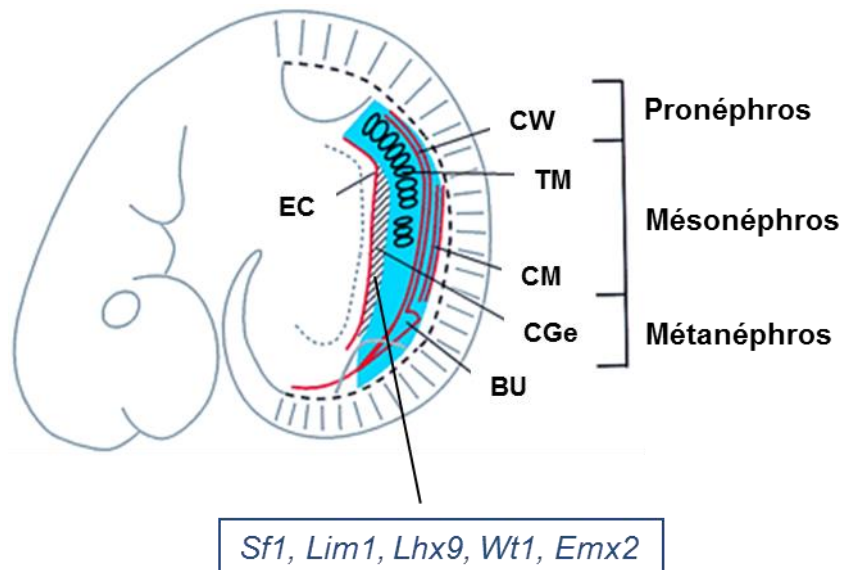


Figure 1 : structure du système urogénital indifférencié de la souris à 10,5 jpc. Les structures épithéliales sont représentées en rouge, les structures mésenchymateuses en bleues et la région rayée représente la crête génitale. (CW) Canal de Wolff ; (TM) Tubules mésonéphrétiques ; (CM) Canal de Müller ; (CGe) Crête génitale ; (BU) Bourgeon urétral ; (EC) épithélium coelomique (Swain and Lovell-Badge 1999). Un certain nombre de gènes dont *Sf1*, *Lim1*, *Lhx9*, *Wnt1* ou encore *Emx2* sont exprimés dans la crête génitale indifférenciée et permettent son maintien et son développement.

1.1 La gonade indifférenciée

a Gènes impliqués dans le développement de la gonade indifférenciée

La gonade indifférenciée doit dans un premier temps se développer. Dans ce but, elle exprime un certain nombre de facteurs (Swain and Lovell-Badge 1999). SF1 est un récepteur nucléaire orphelin identifié, dans un premier temps, comme régulateur de la biosynthèse des stéroïdes dans différents types cellulaires impliqués dans ce processus (Lala, Rice et al. 1992; Ikeda, Lala et al. 1993; Morohashi, Zanger et al. 1993; Lynch, Lala et al. 1993). Pendant le développement embryonnaire murin, SF1 est exprimé dans la crête génitale indifférenciée entre 9 et 12 jpc (Ikeda, Shen et al. 1994). Il a été montré que l'invalidation du gène *Sf1* induisait une agénésie gonadique (Luo, Ikeda et al. 1995). Ce facteur est donc primordial pour le maintien et le développement gonadique. Un autre gène, le gène *Lim1*, qui fait partie de la classe des protéines à domaine homeobox LIM, est également un facteur important pour le maintien de la gonade indifférenciée. Les souris KO (Knock-out) pour le gène *Lim1* ne présentent ni reins ni gonades (Shawlot and Behringer 1995). Un second gène de la famille LIM est également essentiel au bon développement de la gonade, le gène *Lhx9*. Les souris invalidées pour ce gène ne présentent qu'un développement très limité des gonades dans lesquelles les cellules germinales ont migré mais les cellules somatiques n'ont pas proliféré et ne se sont pas différenciées (Birk, Casiano et al. 2000). Le gène *Wt1* est également impliqué dans le développement précoce de la gonade et du rein. Une délétion de ce gène à l'état homozygote empêche le développement de la gonade et retarde celui du rein (Kreidberg, Sariola et al. 1993). Un phénotype identique est observé chez des souris invalidées pour le gène à domaine homeobox *Emx2* (Miyamoto, Yoshida et al. 1997) (figure 1).

b Cellules Germinales Primordiales : spécification, migration et colonisation de la crête génitale

Les cellules germinales primordiales (CGP) dérivent de cellules pluripotentes présentes dans une région de l'épiblaste adjacente à l'ectoderme extra embryonnaire (Lawson and Hage 1994). Des signaux interviennent pour induire l'expression de certains facteurs dans les cellules de l'épiblaste et les faire se spécifier en CGP.

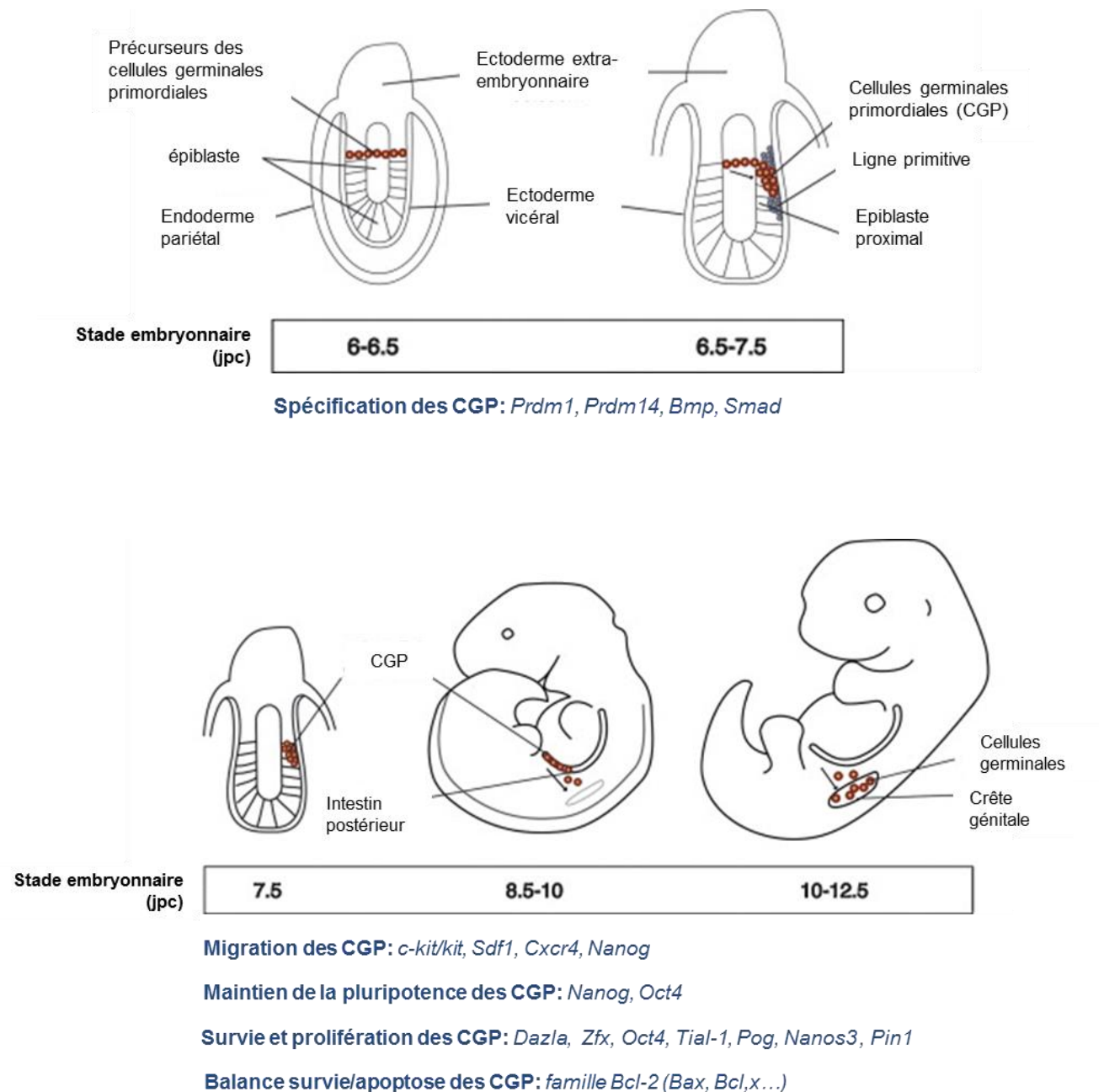


Figure 2: spécification et migration des cellules germinales primordiales. Les cellules de l'épiblaste proches de l'ectoderme extra-embryonnaire acquièrent la compétence pour devenir des CGP à 6,5 jpc. A 7,5 jpc, certaines de ces cellules deviennent des CGP et commencent à migrer. Les CGP entrent dans l'embryon à partir d'une invagination de l'intestin postérieur embryonnaire et migrent le long du mésentère dorsal entre 8,5 et 10 jpc pour atteindre la crête génitale. Les CGP colonisent ensuite la crête génitale à partir de 10 à 12,5 jpc (Ewen and Koopman 2010). L'expression de nombreux gènes est nécessaire à la spécification, à la migration, à la survie et à la prolifération des CGP. Ces gènes sont énumérés en bleu.

Les protéines BLIMP1 (B Lymphocyte-induced maturation protein 1) et PRDM14 (PR domain zinc finger protein 14) sont nécessaires à la suppression du programme somatique des cellules épiblastiques et à la spécification des CGP. En effet, les souris KO pour les gènes *Prdm1* (codant pour la protéine *BLIMP1*) et *Prdm14* ne présentent pas de marqueurs spécifiques des CGP et sont stériles du fait du manque de spécification des CGP pendant l'embryogenèse (Yamaji, Seki et al. 2008); (Kurimoto, Yamaji et al. 2008) (figure 2). De nombreux facteurs de la famille du TGF- β (BMP, SMAD...) interviennent également dans la spécification des CGP. Cet aspect sera traité dans un chapitre ultérieur de ce manuscrit (page 79).

La migration des CGP est due à l'intervention de plusieurs facteurs. Il a été montré que le récepteur tyrosine kinase C-KIT et son ligand interviennent dans la multiplication et la migration de ces cellules. En effet, C-KIT est exprimé par les CGP et le KIT ligand par les cellules somatiques présentes tout le long du parcours des CGP jusqu'à la crête génitale. De plus, il a été montré chez la souris que les mutations White spotting (W) et Steel (Sl) sur les gènes codant respectivement pour C-KIT et son ligand, entraînent la stérilité chez les homozygotes (McLaren 1992). Plus récemment, des expériences de chimio-attraction ont montré que le KIT ligand était nécessaire à la migration des CGP (Farini, La Sala et al. 2007). SDF1 (stromal cell derived factor 1), aussi appelé CXCL12, et son récepteur CXCR4 fonctionnent également comme un système d'attraction des CGP. Cette signalisation n'est pas nécessaire à la sortie des CGP du mésoderme mais semble indispensable pour les stades plus tardifs de migration dans la crête génitale. En effet, seules peu de CGP atteignent la crête génitale chez les souris invalidées pour *Sdf1* ou *Cxcr4* (Molyneaux, Zinszner et al. 2003) (Ara, Nakamura et al. 2003) (figure 2). Les gènes *Nanog* et *Oct4* sont connus depuis longtemps comme des gènes dont l'expression permet de maintenir la pluripotence des CGP au long de leur parcours. Plus récemment, *Nanog* a été décrit comme intervenant également dans la migration et la survie des CGP (Yamaguchi, Kurimoto et al. 2009).

c Prolifération, survie, apoptose des CGP

Le facteur DAZLA intervient dans la survie des CGP. En effet, les souris KO pour le gène *Dazl* présentent une déplétion du stock de cellules germinales et une absence de production de gamète à l'âge adulte (Ruggiu, Speed et al. 1997).

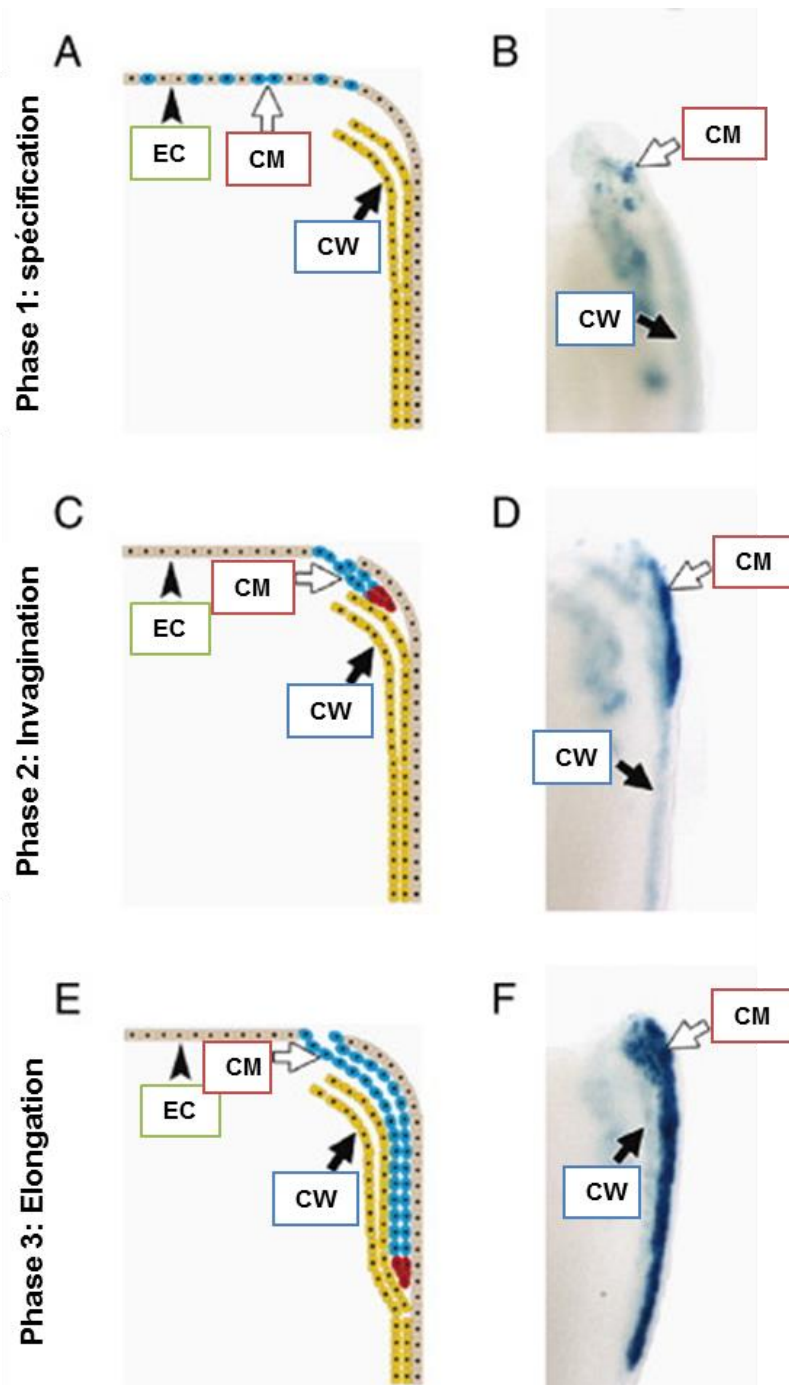


Figure 3. Développement des canaux de Müller en trois phases. Dans la première phase, les cellules de l'épithélium coelomique sont déterminées pour devenir des cellules du canal de Müller (A et B). Après la spécification, les cellules vont s'invaginer vers la région caudale près du canal de Wolff (C et D). Une fois au contact du canal de Wolff, la troisième phase commence (E et F). Il s'agit de l'élongation rostro-caudale du canal de Müller le long du canal de Wolff pour rejoindre le sinus urogénital. Cellules bleues : cellules mésoépithéliales du canal de Müller, cellules rouges: cellules précurseurs du canal de Müller en prolifération ; cellules grises: cellules de l'épithélium coelomique ; cellules jaunes: cellules du canal de Wolff ; CW : canal de Wolff ; CM: canal de Müller ; EC : épithélium coelomique (Orvis and Behringer 2007).

Les facteurs ZFX (Zinc-finger protein X-linked) (Luoh, Bain et al. 1997), TIAR (Tial-1 related protein) (Beck, Miller et al. 1998), POG (proliferation of germ cells) (AgoulNIK, Lu et al. 2002), NANOS3 et PIN1 sont également impliqués dans la survie mais peuvent également jouer un rôle dans la prolifération des CGP au cours de leur migration (Tsuda, Sasaoka et al. 2003) (Atchison, Capel et al. 2003) (figure 2).

Les membres de la famille BCL-2 sont connus pour réguler l'apoptose dans de nombreux types cellulaires. La balance entre facteurs pro et anti-apoptotiques est primordiale pour qu'une fonction reproductrice correcte se mette en place. Au cours de leur migration et avant la colonisation de la crête génitale, des facteurs pro-apoptotiques tels que BAX régulent le nombre de CGP (Greenfeld, Pepling et al. 2007). Le facteur BCL-X joue un rôle crucial dans la survie des cellules germinales au cours de la formation de la gonade. Chez les souris présentant une diminution de l'expression de *Bcl-x*, le nombre de CGP est réduit à 13,5 et 14,5 jpc par rapport aux souris contrôles (Rucker, Dierisseau et al. 2000). Cette perte des CGP dans la crête génitale entraînera une diminution du nombre de follicules primordiaux et primaires chez la souris adulte (figure 2).

1.2 Le tractus génital indifférencié

Chaque individu présente pendant une partie de la vie embryonnaire les deux types de canaux reproducteurs et a donc le potentiel de développer un système reproducteur mâle ou femelle. Pour qu'un développement mâle ou femelle normal se produise, il faut qu'un des deux couples de canaux régresse et l'autre se différencie.

Le tractus génital interne indifférencié comprend les canaux de Wolff et les canaux de Müller. Situés dans la région du mésonéphros, ils s'allongent par leur extrémité caudale pour rejoindre le sinus urogénital débouchant à la base du tubercule génital (à l'origine du tractus génital externe). Les canaux de Wolff (ou canaux mésonéphrétiques) se mettent en place en premier le long du rein embryonnaire et pourront se différencier en canal défèrent, épидидymes et vésicules séminales. Chez la souris, les canaux de Wolff sont complets à 10,5 jpc. Les canaux de Müller (ou canaux paramésonéphrétiques) se développent antéro-postérieurement le long des canaux de Wolff entre 11,5 et 13,5 jpc chez la souris et ont le potentiel de se développer en oviducte, utérus et partie supérieure du vagin. Grant Orvis et Richard Behringer proposent une formation du canal de Müller en trois phases (Orvis and Behringer 2007) (figure 3). Durant la première phase, les cellules de l'épithélium coelomique se spécifient pour devenir cellules formatrices du canal de Müller. Ce processus est encore

très peu connu. Cette spécification pourrait être due à l'expression de *Lim1* dans les cellules de l'épithélium coelomique (Kobayashi, Shawlot et al. 2004). Suite à la spécification de ces cellules, l'expression de *Wnt4* dans le mésonéphros est nécessaire pour que l'épithélium coelomique puisse induire l'invagination de ces cellules et la formation du canal de Müller. L'implication du facteur WNT4 a été déterminé par l'étude des souris invalidées pour ce gène qui ne présentaient pas de canaux de Müller (Vainio, Heikkila et al. 1999). La troisième phase de la formation du canal de Müller correspond à son élongation entre le canal de Wolff et l'épithélium coelomique. Ce dernier est d'ailleurs nécessaire au développement du canal de Müller. En effet, il a été montré que le facteur LIM1 était essentiel pour le maintien du canal de Wolff et la perte de l'expression de *Lim1* dans le canal de Wolff est également à l'origine d'un développement incomplet du canal de Müller (Kobayashi, Kwan et al. 2005). De plus, les souris mutantes pour les gènes *Pax2* et *Emx2* présentent une invagination du canal de Müller mais qui ne s'allongera pas du fait de l'absence des canaux de Wolff (Torres, Gomez-Pardo et al. 1995 ; Miyamoto, Yoshida et al. 1997). Le canal de Wolff n'agit pas seulement comme guide physique mais il produit un signal nécessaire à l'élongation du canal de Müller. *Wnt9b* est exprimé dans l'épithélium du canal de Wolff et la perte de l'expression de ce gène empêche l'élongation complète du canal de Müller bien que le canal de Wolff soit toujours intact (Carroll, Park et al. 2005). Quand *Wnt9b* n'est plus exprimé, le canal de Müller est capable de s'invaginer mais pas de s'allonger vers la partie caudale. Ceci suggère que le canal de Wolff n'est pas nécessaire aux premières étapes de la formation du canal de Müller mais est essentiel à son élongation. Une étude de 2009 chez le rat montre que l'élongation du canal de Müller est essentiellement due à deux processus : d'une part la prolifération des cellules de l'extrémité postérieure (cellules rouges sur la figure 3) sous la dépendance de la voie PI3K/AKT et d'autre part la migration des cellules mésoépithéliales müllériennes le long du canal de Wolff (cellules bleues sur la figure 3) (Fujino, Arango et al. 2009).

Il a également été mis en évidence que le canal de Wolff présente une structure épithéliale une fois formé alors que le canal de Müller reste au stade de mésoépithélium et ne présentera une structure épithéliale que chez la femelle chez qui il va se différencier. Chez le mâle, le canal de Müller reste au stade mésopithélial (Orvis and Behringer 2007).

2 La différenciation sexuelle de la gonade et du tractus génital

2.1 La différenciation de la gonade

La différenciation de la gonade est déterminée par le sexe génétique, XY chez le mâle et XX chez la femelle. C'est le gène *Sry* (sex determining region on Y) porté par le chromosome

Y qui est responsable de la différenciation testiculaire. Ce gène a été cloné initialement chez l'Homme mais son expression a été analysée chez la souris (Berta, Hawkins et al. 1990) (Koopman, Munsterberg et al. 1990). Chez la souris, le gène *Sry* s'exprime dans les cellules somatiques de la crête génitale entre 10.5 et 11.5 jpc juste avant la différenciation, et va induire une cascade d'événements conduisant à la différenciation testiculaire. Très récemment, il a été montré que la présence des deux gènes *Sry* et *Eif2s3y* est suffisante pour remplacer le chromosome Y et permettre la génération de mâles fertiles (Yamauchi, Riel et al. 2014). Chez la femelle, l'absence d'expression du gène *Sry* permettra aux cellules somatiques de s'orienter vers une différenciation en cellules de la pré-granulosa (McLaren 1991).

a ***Chez le mâle***

La présence du gène *Sry* entraîne une différenciation morphologique de la gonade primitive en testicule à 12 jpc chez la souris (tableau 1). La différenciation des cellules de Sertoli du testicule fœtal est la 1ère étape dans l'organogénèse testiculaire (Magre and Jost 1991). Ces cellules s'associent les unes aux autres par des interdigitations et des jonctions membranaires, englobant progressivement les cellules germinales donnant ainsi naissance à des cordons séminifères délimités par une membrane basale. L'hormone anti-Müllérienne (AMH) est le premier facteur endocrine sécrété par les cellules de Sertoli (Tran, Muesy-Dessole et al. 1977).

Les cellules de Leydig productrices de testostérone, apparaissent chez toutes les espèces après les cellules de Sertoli. Elles se différencient au sein du tissu mésenchymateux entre les cordons dans l'espace interstitiel (tableau 1).

A 18 jpc chez la souris, les testicules qui étaient retenus en position abdominale par le gubernaculum vont migrer vers le scrotum. Le facteur INSL3 (Insulin Like Factor 3) induit le raccourcissement du gubernaculum et permet la descente du testicule dans le scrotum (Nef and Parada 1999). Chez la souris, les premiers transcrits d'*Ins13* sont détectés à 13.5 jpc dans les cellules de Leydig et son expression reste constante jusqu'à la troisième semaine de vie post-natale (Zimmermann, Steding et al. 1999).

b ***Chez la femelle***

Après leur migration, les CGP prolifèrent par mitose et se différencient en ovogonies. A 13-14 jpc chez la souris, ces cellules entrent en prophase méiotique qui se stoppe au stade diplotène, on parle alors d'ovocyte I (tableau 1). Il a été montré que l'acide rétinoïque était à

l'origine de l'entrée en méiose des ovogonies (Koubova, Menke et al. 2006). Une forte concentration d'acide rétinoïque entraîne l'expression du facteur *Stra8* dans l'ovaire fœtal et induit l'entrée en méiose. Il s'agit de la première étape morphologique de la différenciation ovarienne. Les follicules vont ensuite se former par regroupement de cellules somatiques avec des ovocytes, au sein de structures épithéliales, appelées cordons ovariens ou ovigères. Au début de la folliculogénèse, ces cordons se fragmentent et chaque follicule primordial se constitue par association d'un ovocyte I et d'une assise de cellules somatiques, les cellules de la granulosa. L'origine des cellules de la granulosa a été discutée et peut varier en fonction de l'espèce. Elles peuvent être issues du mésonephros, de l'épithélium coelomique ou du mésenchyme. C'est cette dernière hypothèse qui a été retenue pour le modèle murin en générant une souris exprimant EGFP sous contrôle du promoteur de *Sry* (Albrecht and Eicher 2001). Les cellules pré granulosa sont présentes dans la gonade avant la migration des cellules issues de l'épithélium coelomique. Ces données ont été complétées par une autre équipe (Mork, Maatouk et al. 2012). Ils ont montré que les cellules de l'épithélium coelomique se multiplient à partir de 11,5 jpc chez la souris et donneront par la suite les cellules de la granulosa médullaires, les plus au centre de l'ovaire. Les cellules de la granulosa les plus externes se différencient à partir de l'épithélium de surface ovarien dans les jours qui suivent la naissance chez le rongeur. La formation des follicules primordiaux a lieu in utero chez la femme alors qu'elle se déroule dans les 3 jours qui suivent la naissance chez les rongeurs (Pepling and Spradling 2001). Les cellules thécales ne se différencient que plus tard, autour des follicules en croissance (Young and McNeilly 2010). Elles seraient issues de cellules mésenchymateuses du stroma ovarien (Erickson, Magoffin et al. 1985). La présence des cellules germinales est indispensable à la formation des follicules car en leur absence, des cordons stériles se mettent en place mais dégénèrent ensuite, laissant un ovaire composé uniquement de stroma (McLaren 1991).

2.2 La différenciation du tractus génital

a Chez le mâle

Au moment où débute la différenciation gonadique mâle, le tractus est encore sexuellement indifférencié. On observe la présence des deux types de canaux : les canaux de Wolff et de Müller. Vers 14 jpc, les canaux de Müller commencent à dégénérer dans le sens cranio-caudal (Arango, Kobayashi et al. 2008).

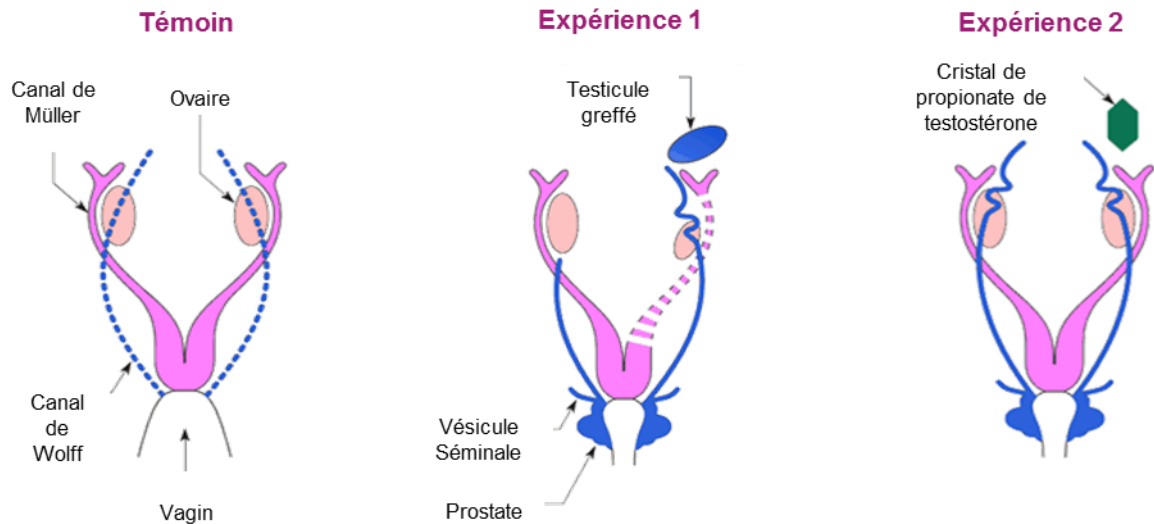


Figure 4 : Les expériences de Jost (1947-1953). Un testicule greffé à la place d'un ovaire foetal entraîne une régression des canaux de Müller chez le fœtus lapin femelle de 21 jours (expérience 1). En revanche, la greffe d'un cristal de propionate de testostérone n'induit pas de régression des canaux de Müller (expérience 2). C'est donc une substance testiculaire autre que la testostérone qui induit la régression des canaux de Müller. Jost avait découvert l'hormone anti Müllérienne (AMH).

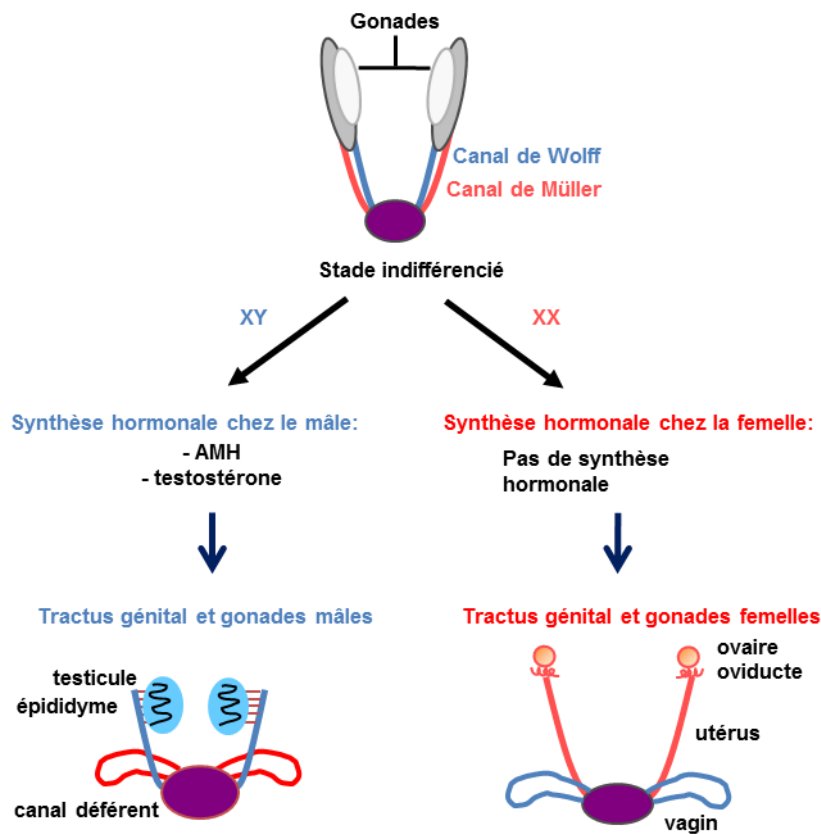


Figure 5 : Différenciation sexuelle du tractus génital. Chez le mâle, la première hormone sécrétée par le testicule est l'AMH produite par les cellules de Sertoli. L'AMH va induire la régression des canaux de Müller. Les cellules de Leydig vont ensuite produire de la testostérone, responsable du maintien et de la masculinisation du tractus. Chez la femelle, l'absence de production hormonale va entraîner la régression des canaux de Wolff ainsi que le maintien et la différenciation des canaux de Müller (Behringer 1994).

Une fois la régression des canaux de Müller complète, la différenciation des canaux de Wolff commence. Les parties supérieures et inférieures donneront respectivement l'épididyme et le canal déférent porteur de la vésicule séminale dans sa position terminale. Les organes génitaux externes se forment à partir du tubercule génital à 16 jpc chez la souris.

Ces observations morphologiques ont été appuyées par les travaux d'Alfred Jost sur le fœtus de lapin (Jost 1953). Après avoir implanté à des fœtus lapin femelle de 20 jours un testicule du même âge à proximité de l'ovaire, il a observé une régression du canal de Müller du côté de la greffe. Il a donc émis l'hypothèse qu'une hormone produite par le testicule était responsable de cette régression. Pour compléter ses premières expériences, il a ensuite implanté un cristal de propionate de testostérone à proximité d'un ovaire de fœtus femelle de 20 jours. Le canal de Müller restait alors intact. Alfred Jost en déduisit donc que la substance responsable de la régression des canaux de Müller produite par le testicule n'était pas la testostérone. Il appellera cette substance «inhibiteur Müllerien». Cet inhibiteur sera identifié 30 ans plus tard comme l'hormone anti-Müllerienne ou « anti-Müllerian hormone » (AMH) également dénommée « Mullerian inhibiting substance » (MIS) (figure 4).

b ***Chez la femelle***

La différenciation du tractus femelle est un événement passif. En l'absence de sécrétion d'AMH par la gonade fœtale, les canaux de Müller sont maintenus et la dégénérescence des canaux de Wolff va débiter à partir de 15 jpc chez la souris. Les canaux de Müller vont se différencier par la suite en oviductes, utérus et partie supérieure du vagin (figure 5). Les anomalies müllériennes correspondent à un ensemble de malformations utéro-vaginales congénitales résultant d'un défaut de développement, de fusion ou de résorption des dérivés müllériens. L'étiologie des anomalies müllériennes est encore inconnue pour la plupart d'entre elles. C'est le cas pour le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) qui correspond à une pathologie dont la caractéristique clinique première est l'absence d'utérus et des 2/3 supérieurs du vagin. Il a été suggéré que l'AMH ou son récepteur pouvaient être responsables de cette pathologie mais une étude contradictoire a écarté cette hypothèse (Folch, Pigem et al. 2000 ; Resendes, Sohn et al. 2001).

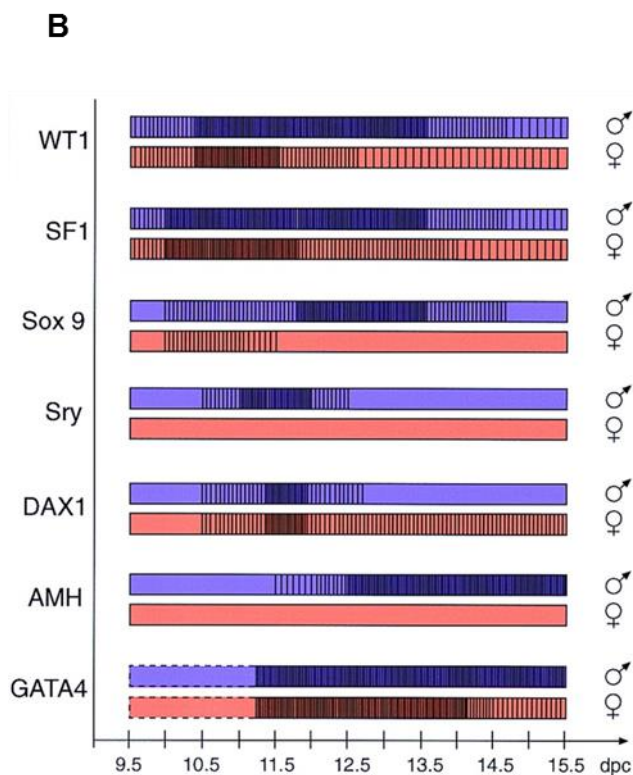
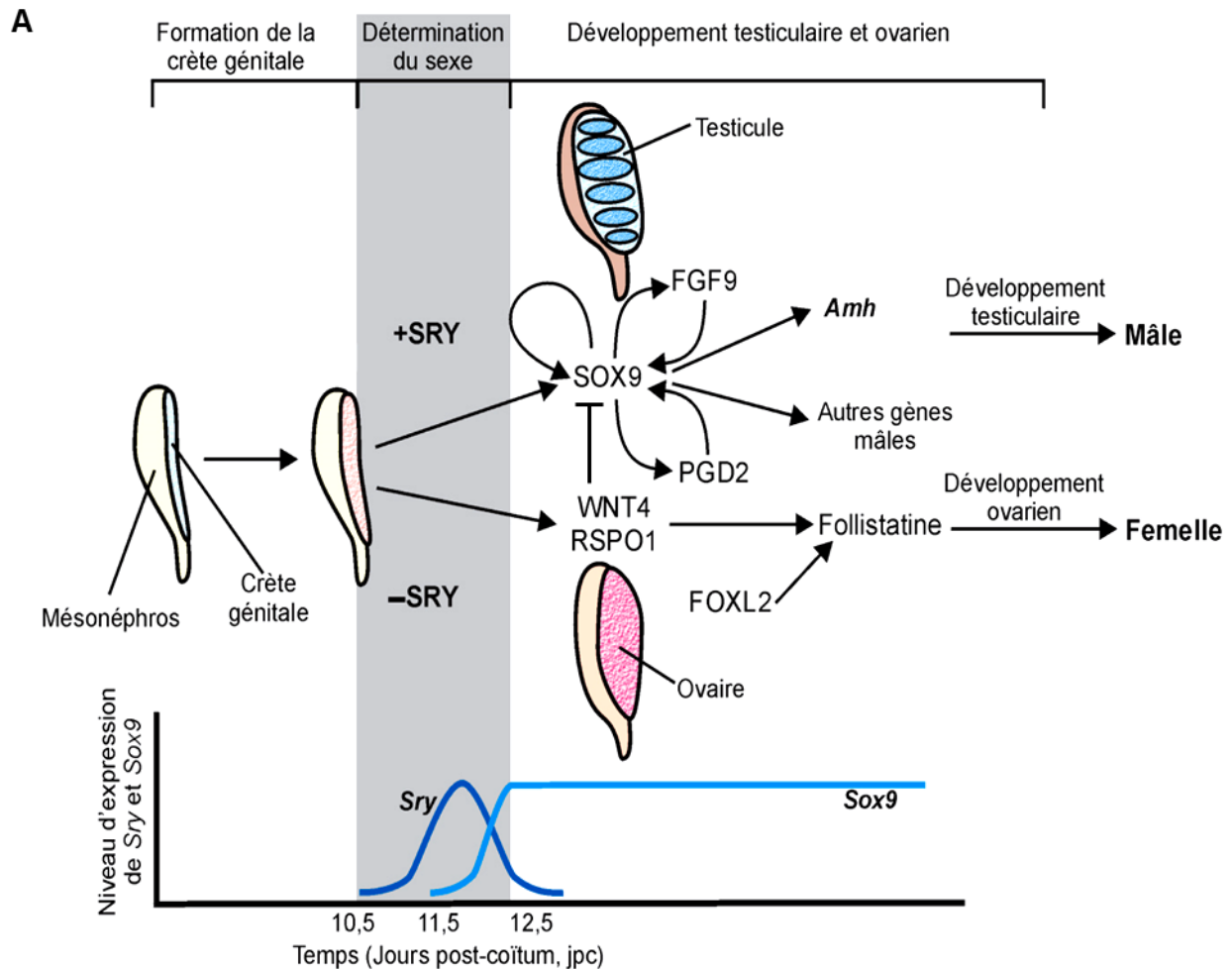


Figure 6 : La détermination sexuelle chez la souris A. La détermination sexuelle est due à une cascade d'activation précise de nombreux gènes. La zone grise représente la période de détermination sexuelle. Pendant l'embryogénèse chez la souris, la gonade bi-potentielle apparaît à 10.5 jpc, les cellules somatiques XY expriment alors *Sry* dont l'expression atteint un pic à 11.5 jpc et diminue. Quelques heures plus tard, le gène *Sox9* s'active à son tour. L'expression de *Sox9* augmente jusqu'à 12.5 jpc et se maintient ensuite à ce niveau. Ce maintien est dû à des boucles de régulation positive (incluant *Fgf9*, *Pgd2* et *Sox9* lui-même). Cette cascade permet la mise en place des cordons séminifères. En l'absence de *Sry*, des gènes tels que *Wnt4*, *Rspo1* ou encore *Foxl2* s'activent et induisent le développement de l'ovaire. B. Profils d'expression des différents gènes impliqués dans le déterminisme du sexe au cours du développement chez la souris mâle (■) et femelle (■). (Kashimada and Koopman 2010)

3 Régulation génétique de la différenciation sexuelle chez les mammifères

Les études les plus détaillées de la différenciation sexuelle des mammifères ont été réalisées en utilisant la souris comme modèle. Chez la souris, la gonade primordiale, appelée également crête génitale se développe à 10 jpc. A ce stade, il n'y a pas de différences morphologiques et fonctionnelles entre les crêtes génitales mâles et femelles. Les deux structures présentent des cellules précurseurs capables de se différencier en cellules de Sertoli ou en cellules de la granulosa. Le développement des gonades dépendant du sexe est déterminé par l'expression du gène *Sry* dans les cellules somatiques de la crête génitale XY à 10.5 jpc (Kashimada and Koopman 2010). SRY va alors activer l'expression de *Sox9* (SRY box containing gene 9) dans les cellules précurseurs des cellules de Sertoli lequel va réguler d'autres gènes tels que *Fgf9* ou *Ptgds* (codant pour la prostaglandine PGD2) impliqués dans la différenciation des cellules de Sertoli (Barrionuevo, Burgos et al. 2012). Une fois différenciées, elles vont alors s'assembler pour former les cordons séminifères et stimuler le développement des cellules germinales mâles et des cellules de Leydig productrices d'androgènes.

A l'inverse, en l'absence de SRY dans les gonades XX, des gènes tels que *Wnt4* (wingless-type MMTV integration site family member 4), *Rspo1* (R-spondin homolog (xenopus laevis)) et *Foxl2* (forkhead box L2) commencent à s'exprimer à 11.5-12.5 jpc. En l'absence de *Rspo1* et *Wnt4* les gonades XX présentent à la naissance des caractéristiques testiculaires (Chassot, Gregoire et al. 2008 ; Tomizuka, Horikoshi et al. 2008). Par ailleurs, *Foxl2* est essentiel à la maturation folliculaire (Schmidt, Ovitt et al. 2004). Ces voies indépendantes convergent pour réprimer l'expression de *Sox9*. Une cascade se met en place pour activer l'expression d'autres gènes comme la follistatine qui va permettre par la suite la différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque ainsi que la formation des follicules ovariens (Kashimada and Koopman 2010).

Il a récemment été montré que la voie des Wnt/ β -caténine inhibait l'expression de *Sox9* et de l'*Amh* dans la gonade femelle (Bernard, Ryan et al. 2012). L'activation de cette voie dans des gonades mâles indifférenciées de souris (11.5 jpc) induit une réversion sexuelle. En effet, la β -caténine empêcherait la fixation de *Sf1* sur la région enhancer de *Sox9* et donc la différenciation sertolienne (figure 6).

II La folliculogenèse

1 Introduction

L'ovaire adulte est constitué essentiellement de structures particulières, les follicules. Ils sont à différents degrés de maturation et de développement et sont tous constitués d'une cellule germinale, l'ovocyte, entourée de cellules somatiques, les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. L'ovaire présente deux fonctions majeures. La première est la stéroïdogenèse. Il s'agit de la fonction endocrine de l'ovaire, c'est à dire la production d'hormones stéroïdes femelles, essentiellement l'oestradiol et la progestérone. Cette fonction résulte de l'étroite collaboration entre les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. La seconde fonction de l'ovaire est l'ovogenèse. Il s'agit de la fonction exocrine de l'ovaire qui consiste à produire un (ou plusieurs chez les rongeurs) ovocyte mature capable d'être fécondé et d'assurer les premières étapes du développement embryonnaire.

Chez la femelle, les cellules germinales, appelées ovogonies, prolifèrent dans les cordons ovigères, jusqu'à leur entrée en prophase méiotique. Une fois entrées en méiose, les cellules germinales cesseront de se multiplier. A la fin du processus de formation des follicules primordiaux, à la naissance chez l'homme ou à 3 jours post-nataux chez la souris, le stock de follicules est formé et il n'y aura pas de renouvellement possible. A partir de ce stade, Le nombre de cellules germinales dans l'ovaire ne fera que diminuer. La fin de la fonction reproductrice est due à l'épuisement de la réserve ovarienne. Chez la femme, il s'agit du phénomène de ménopause. Il s'agit là d'un dogme bien connu en biologie de la reproduction. Cependant, certaines études ont remis en question l'aspect non renouvelable du pool de follicules primordiaux en supposant la présence de cellules souches germinales en périphérie de l'ovaire et dans la moelle osseuse (Johnson, Canning et al. 2004 ; Johnson, Bagley et al. 2005).

L'entrée en méiose s'effectue dès le stade fœtal à 13-14 jpc chez la souris (tableau 1). Cette méiose évolue jusqu'au stade diplotène de la première division de méiose. Tous les ovocytes restent bloqués et pour certains, à partir de la puberté, la méiose reprendra juste avant l'ovulation. Cette reprise de la méiose aboutira à l'expulsion du premier globule polaire. Puis cet ovocyte se bloquera en métaphase de deuxième division de méiose. La méiose ne se terminera que si la fécondation a lieu.

La formation des follicules primordiaux se déroule pendant la vie fœtale ou la période péri-natale en fonction des espèces de mammifères (tableau 1). Chez la souris, la

fragmentation des cordons ovigères ainsi que la formation des follicules primordiaux a lieu dans les 3 jours qui suivent la naissance (Pepling and Spradling 2001). Les cellules somatiques aplaties (pré-granulosa) s'insinuent entre les ovocytes : le follicule primordial est formé.

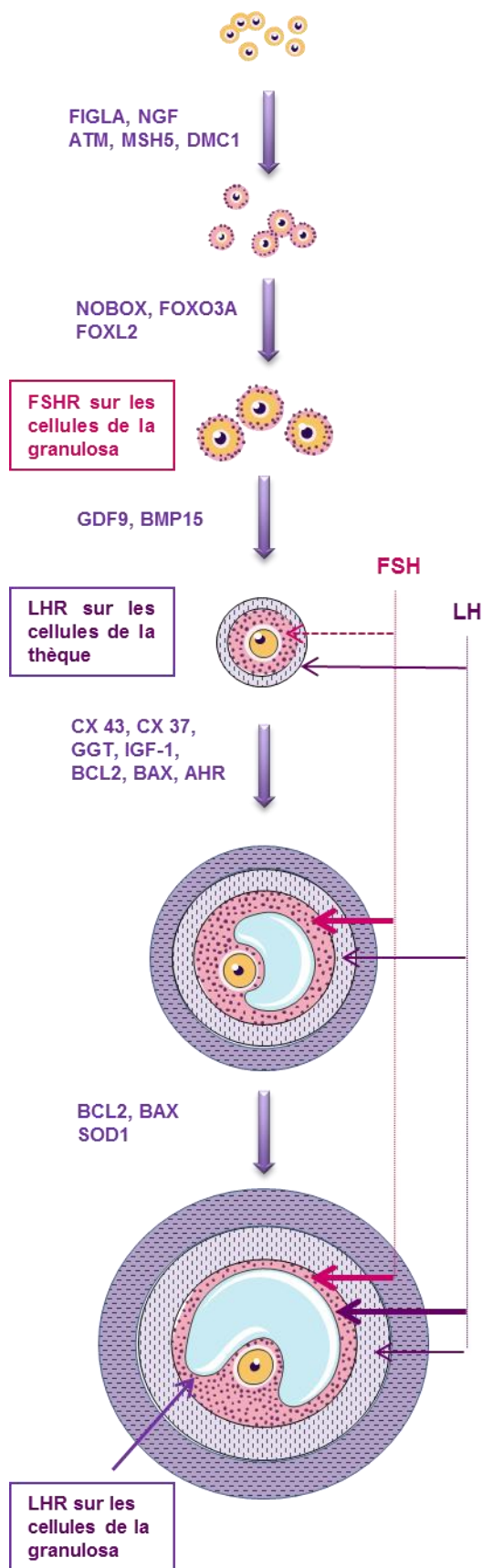
La majeure partie des cellules germinales va dégénérer que ce soit lors de la multiplication, lors de l'entrée en méiose ou pendant les étapes plus tardives de la folliculogénèse. On parle d'atrésie folliculaire. Ce phénomène a lieu pendant la vie fœtale aussi bien que pendant la vie reproductive. Dans le fœtus femelle, à 2 mois de grossesse, on compte environ 500 000 cellules germinales et à 5 mois de 5 à 7 millions. A partir de ce stade, on ne fera que perdre des cellules germinales. Au cours d'une vie reproductive seulement 300 à 400 ovocytes seront expulsés. 99% des follicules dégénèrent dans l'espèce humaine. Chez la souris, on compte environ 6000 cellules germinales à 13.5 jpc. Il n'en restera qu'environ 2000 à la naissance (Pepling and Spradling 2001).

2 Evolution morphologique et moléculaire des follicules

Un système de classification a été bien établi pour différencier les stades folliculaires (Edson, Nagaraja et al. 2009).

2.1 Le follicule primordial

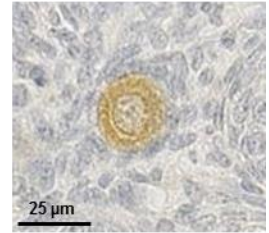
Pendant la vie foetale chez la femme, les ovocytes I vont s'entourer d'une couche unistratifiée de cellules épithéliales folliculaires aplaties. Il s'agit des cellules de la pré-granulosa (figure 7). Cette étape se fait juste après la naissance chez les rongeurs (Pepling and Spradling 2001). Les cellules de la granulosa sont séparées du reste du stroma ovarien par une membrane basale. Les follicules primordiaux représentent la majorité des follicules dans l'ovaire. Les cellules de la granulosa à ce stade ne sont pas encore capables de produire des oestrogènes et sont indépendantes des gonadotropines hypophysaires (Skinner 2005). Chez les mammifères, le pool de follicules primordiaux au repos constitue l'ensemble de la réserve pour toute la vie reproductive. Un des facteurs les plus importants pour la mise en place des follicules primordiaux est FIGLA, un facteur de transcription spécifique des cellules germinales. Les souris KO pour *Figla* sont stériles du fait de l'absence de follicules et d'ovocytes (Soyal, Amleh et al. 2000). Cette anomalie n'apparaît qu'après la naissance. En effet, les ovaires des souris contrôles et des souris invalidées pour *Figla* présentent le même nombre de cellules germinales à 18 jpc.



Ovocyte I

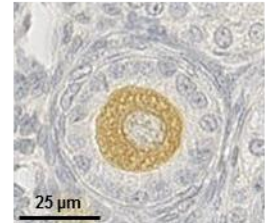
Follicule primordial:

L'ovocyte I est entouré d'une couche de cellules squameuses de la granulosa aplaties



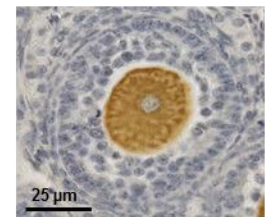
Follicule primaire:

L'ovocyte I est entouré d'une couche de cellules de la granulosa cubiques.



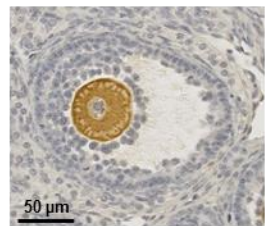
Follicule secondaire:

L'ovocyte I est entouré d'une couche pluristratifiée de cellules de la granulosa. Un deuxième type cellulaire apparaît, les cellules de la thèque interne.



Follicule à antrum:

L'ovocyte I est entouré d'une couche pluristratifiée de cellules de la granulosa dans laquelle apparaît une cavité, l'antrum. Les cellules de la thèque interne se développent et les cellules de la thèque externe apparaissent.



Follicule mûr (De Graaf):

Il s'agit d'un follicule antral particulièrement grand qui aboutira à l'expulsion de l'ovocyte précédée de la reprise de la méiose

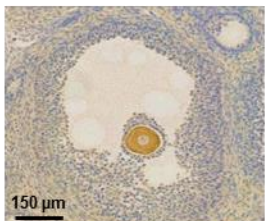


Figure 7 : Les différents stades folliculaires: Au cours du développement folliculaire, le follicule va évoluer pour permettre la maturation de l'ovocyte. Les follicules primordiaux sont les plus nombreux et constituent la réserve folliculaire. Ils vont ensuite évoluer jusqu'au stade primaire, puis secondaire. Une cavité se creuse dans les follicules à antrum. Cette cavité va grossir pour aboutir à un follicule mûr (De Graaf). Les cellules germinales contenues dans les follicules présentés sont marquées ici à l'aide de l'anticorps dirigés contre MSY2. Les immunohistochimies ont été réalisées par Clémentine Chalmei (espèce rat, données non publiées).

On peut également noter le facteur NGF (Nerve growth factor) important pour la mise en place des follicules primordiaux. Chez les souris invalidées pour le gène *Ngf*, on retrouve une population importante d'ovocytes nus par rapport aux souris contrôles. Ce phénomène montre une formation incomplète des follicules primordiaux juste après la naissance (Dissen, Romero et al. 2001).

Certaines protéines intervenant dans la détection des dommages à l'ADN sont également importantes pour la formation des follicules primordiaux. Chez les souris invalidées pour les gènes *Dmc1* (Disrupted meiotic cDNA1 homolog), *Msh5* (mutS homolog 5) ou *Atm* (ataxia telangectasia-mutated homolog), on observe une diminution importante du nombre de follicules primordiaux due à une augmentation de l'apoptose ovocytaire (Barlow, Liyanage et al. 1998 ; Di Giacomo, Barchi et al. 2005). En effet, ces souris sont incapables de réparer l'ADN endommagé au moment de l'entrée en méiose des ovocytes qui s'engagent alors vers la voie de l'apoptose. Cette perte ovocytaire semble évitée lorsque SPO11, une enzyme impliquée dans la formation des cassures de l'ADN au cours de la prophase méiotique (Mahadevaiah, Turner et al. 2001), est invalidée (Di Giacomo, Barchi et al. 2005).

2.2 Le follicule primaire

Lors du passage du follicule primordial au follicule primaire, l'épithélium folliculaire constitué de cellules de la granulosa qui entoure l'ovocyte devient cubique (figure 7). Les récepteurs de FSH apparaissent à ce stade sur les cellules de la granulosa, leur nombre augmente légèrement et progressivement dans les follicules préantraux, reste stable dans les follicules à antrum et enfin diminue au stade préovulatoire.

Un facteur ovocytaire, NOBOX, est important dans la formation des follicules primaires. Les souris KO pour ce facteur ne peuvent pas accomplir la transition follicules primordiaux/follicules primaires (Rajkovic, Pangas et al. 2004). Le facteur de transcription FOXO3 est également impliqué dans cette transition. Il est connu pour arrêter le cycle cellulaire en transition G1/S des cellules somatiques chez les mammifères et induire leur apoptose. Il s'exprime dans le noyau de l'ovocyte chez la souris et le rat. De plus, les souris KO pour le gène *Foxo3* présentent une activation de la croissance folliculaire (Castrillon, Miao et al. 2003). De nombreuses autres études ont permis de mettre en évidence que le facteur FOXO3 est impliqué dans le phénomène de « dormance » des follicules primordiaux (Moniruzzaman and Miyano 2010). FOXL2 a été montré comme intervenant à ce stade. Ce

facteur est important pour le maintien et la différenciation des cellules de la granulosa. Chez les souris invalidées pour ce gène, les cellules de la granulosa squameuses présentes dans le follicule primordial ne peuvent pas se différencier en cellules cuboïdales représentatives du stade follicule primaire (Schmidt, Ovitt et al. 2004).

2.3 Le follicule secondaire

Lorsque les follicules primaires persistent, ils se transforment en follicules secondaires au moment où les cellules de la granulosa forment un épithélium pluristratifié. Dans la classification folliculaire, deux stades de follicules secondaires sont différenciés. On distingue les follicules secondaires qui présentent de deux à quatre couches de cellules de la granulosa et les follicules pré-antraux qui présentent de quatre à six couches (Edson, Nagaraja et al. 2009). La zone pellucide, une couche de glycoprotéines, apparaît au stade follicule secondaire entre l'ovocyte et l'épithélium de cellules de la granulosa. Elle est d'ailleurs sécrétée à la fois par l'ovocyte et par les cellules de la granulosa (Maresch, Timmons et al. 1990). Des prolongements cytoplasmiques issus des cellules de la granulosa traversent la zone pellucide pour assurer l'approvisionnement de l'ovocyte. Ces prolongements cytoplasmiques forment des jonctions gap composées de connexines. Les cellules de la granulosa sont également liées entre elles via des jonctions gap qui participent à leur croissance. Un deuxième type de cellule somatique apparaît à ce stade, les cellules de la thèque interne qui expriment le récepteur LH dès leur formation (Young and McNeilly 2010). Dès ce stade, les cellules de la thèque sont capables de répondre à la LH et de produire des hormones stéroïdes.

On ne connaît à l'heure actuelle que peu de facteurs impliqués dans la transition follicule primaire-follicule secondaire. Des facteurs de la famille du TGF- β , tels que GDF9 ou BMP15, interviennent dans la croissance du follicule primaire et dans son passage vers le stade secondaire. Cet aspect sera abordé ultérieurement dans ce manuscrit (page 85).

2.4 Le follicule antral

Lorsque les follicules pré-antraux persistent, ils se transforment en follicules antraux. Cette population apparaît aux environs de 15 jours après la naissance chez la souris (Edson, Nagaraja et al. 2009). Ils se caractérisent par l'apparition d'une cavité folliculaire (antrum) au sein des couches de cellules de la granulosa. Les cellules folliculaires sécrètent un grand nombre de facteurs qui vont s'accumuler dans l'antrum. Les cellules de la thèque sont à ce

stade différenciées en une thèque interne bien vascularisée et en une thèque externe qui forme la transition avec le stroma de l'ovaire et qui contient les vaisseaux mais ne présente pas d'activité stéroïdogène (Young and McNeilly 2010). Un réseau vasculaire bien développé dans la thèque interne est essentiel pour une croissance folliculaire efficace. Le développement des follicules jusqu'à l'apparition de l'antrum est de loin l'étape la plus longue. Chez la ratte, il faut environ 60 jours pour qu'un follicule primordial atteigne le stade antral (McGee and Hsueh 2000).

L'étude des souris invalidées pour les connexines 43 (*Gja1*) et 37 (*Gja4*), a montré que les jonctions gap sont essentielles au développement du stade folliculaire préantral. Chez les souris KO pour *Gja1* et *Gja4*, la folliculogénèse se stoppe au stade préantral et les ovocytes ne sont pas compétents pour poursuivre la méiose (Ackert, Gittens et al. 2001 ; Carabatsos, Sellitto et al. 2000).

La γ -glutamyl transpeptidase, GGT, est une enzyme importante pour lutter contre le stress oxydatif. Chez les souris invalidées pour cette enzyme, l'ovaire à 6 jours après la naissance ne semble pas différent des souris contrôles. Cependant, à partir de la 11^{ème} semaine, aucun follicule antral ni aucun corps jaune n'est observable dans l'ovaire des souris *Ggt* mutantes. La folliculogénèse est bloquée au stade préantral (Kumar, Wiseman et al. 2000).

L'IGF-1 (Insulin like growth factor 1) semble également impliqué dans le passage du stade follicule préantral au stade antral. En effet, les souris invalidées pour ce gène présentent un arrêt de la croissance au stade préantral. De plus, les follicules sont incapables de répondre à une stimulation par les gonatrophines hypophysaires, les souris sont infertiles car incapables d'ovuler (Baker, Hardy et al. 1996).

Au stade antral, de nombreux follicules vont entrer en atresie. Ce processus d'apoptose est régulé par les facteurs de la famille BCL2. La surexpression de *Bcl2* dans les cellules de la granulosa diminue l'apoptose de ces cellules conduisant à une folliculogénèse plus performante et à une augmentation de l'ovulation et du nombre de petits par portée (Hsu, Lai et al. 1996). BAX, un facteur pro-apoptotique, joue également un rôle important dans la croissance folliculaire. La délétion de *Bax* entraîne la présence de follicules atrétiques inhabituels dans lesquels les cellules de la granulosa ne sont pas capables d'entrer en apoptose et sont donc en surnombre (Knudson, Tung et al. 1995). Le nombre de follicules antraux est

également plus important chez les souris KO pour *Bax* (Greenfeld, Babus et al. 2007). D'autres facteurs interviennent dans la régulation du stade antral. Les souris KO pour le récepteur *Ahr* (aryl hydrocarbon recepteur) ou la superoxyde dismutase *Sod1* présentent un nombre réduit de follicules antraux (Benedict, Lin et al. 2000 ; Matzuk, Dionne et al. 1998). Chez les souris KO *Sod1*, la folliculogénèse s'arrête au stade petit follicule à antrum (figure 7).

2.5 Le follicule mûr (de Graff)

Il correspond à un follicule antral particulièrement grand dont on suppose qu'il arrivera jusqu'à l'ovulation. On observe l'apparition de récepteurs pour la LH sur les cellules de la granulosa du follicule pré-ovulatoire (Monniaux, Huet et al. 1997 ; Monniaux, Caraty et al. 2009). La différenciation des cellules somatiques permet la mise en place de la fonction endocrine. Les cellules de la granulosa sont réparties en plusieurs sous-populations à ce stade. Les cellules de la granulosa murales sont disposées en périphérie du follicule et sont responsables de la synthèse hormonale. Les cellules de la granulosa ayant fait saillie dans l'antrum portent le nom de cumulus oophorus et sont situées à la base de l'ovocyte. Ces cellules sont essentielles à la maturation ovocytaire et à la régulation méiotique (Ge, Sui et al. 2008). La couche de cellules de la granulosa adhérente à la cellule germinale est appelée corona radiata. Les rôles précis de ces cellules sont encore peu connus mais il semblerait que la présence d'une corona radiata intacte protège l'ovocyte et facilite la fécondation (Tong, Wu et al. 2012). Les cellules de la granulosa murales sont toujours séparées des cellules de la thèque par une membrane basale. Ces deux types cellulaires vont collaborer pour permettre la sécrétion des stéroïdes ovariens et déclencher l'ovulation.

Les facteurs décrits dans le paragraphe précédent comme intervenant dans la croissance des follicules à antrum sont bien sûr essentiels à l'obtention d'un follicule mûr (figure 7).

3 Maturation folliculaire

La maturation ovocytaire coïncide avec la maturation des cellules somatiques folliculaires. Un dialogue permanent entre les différentes cellules folliculaires permet cette synchronisation (Orisaka, Tajima et al. 2009). On observe au sein du follicule une phase de multiplication des cellules somatiques suivie d'une phase de différenciation. A ce stade, on constate une différenciation du cytoplasme avec une croissance importante de l'ovocyte. A la fin de la folliculogénèse, l'ovocyte toujours bloqué en prophase I, doit être capable de répondre aux signaux qui lui permettront de reprendre la méiose. Juste avant l'ovulation, le

follicule dominant peut répondre au pic de LH pré-ovulatoire. Cela implique une régulation très précise de la croissance folliculaire. On distingue schématiquement deux phases : la croissance folliculaire basale qui s'étend du stade follicule primordial au stade petit follicule à antrum et la croissance folliculaire terminale qui permet le passage du stade petit follicule à antrum au stade de follicule mûr (Monniaux, Caraty et al. 2009).

3.1 La croissance folliculaire basale

De façon continue, des follicules primordiaux vont sortir de leur état de quiescence et commencer leur croissance. Ce phénomène n'est pas encore entièrement compris, cependant, les facteurs pouvant intervenir dans ce processus ont été décrits dans le paragraphe dédié aux follicules primordiaux (page 35). La croissance folliculaire basale est l'étape la plus longue. Elle dure plus de 60 jours chez les rongeurs et près de 200 jours chez la femme (McGee and Hsueh 2000) (figure 8). La croissance folliculaire basale se déroule normalement en l'absence de FSH. En effet, chez la souris invalidées pour la sous-unité β de la FSH ou pour le récepteur de cette hormone, les follicules se développent jusqu'au stade préantral (Kumar, Wang et al. 1997; Abel, Wootton et al. 2000). Chez des femmes porteuses de mutations invalidant plus ou moins fortement le récepteur de la FSH, ou d'une mutation du gène codant la sous-unité β de la FSH, les follicules se développent jusqu'au stade petit follicule à antrum (Tapanainen, Vaskivuo et al. 1998). Il semblerait cependant que la FSH puisse avoir un rôle dans la maturation des follicules pré-antraux en stimulant la prolifération des cellules de la granulosa. Cette hypothèse a été validée dans de nombreuses études *in vitro*. La FSH (et la LH) stimulerait la production d'oestradiol par l'ovaire de 7 jours chez la souris. A ce stade, les follicules sont essentiellement des follicules secondaires et la FSH permettrait donc la maturation de ces follicules via l'augmentation de la production hormonale (Fortune 2003). L'activité de prolifération des cellules de la granulosa atteint un maximum en fin de folliculogenèse basale. C'est au cours de cette phase que s'effectue également l'essentiel de la croissance de l'ovocyte. La croissance et l'atrésie des plus petits follicules sont cependant peu dépendantes des gonadotropines. Du stade follicule primordial au stade follicule secondaire (ou petit follicule à antrum selon l'espèce), la croissance est essentiellement dépendante de facteurs de croissance locaux, produits par l'ovocyte qui agissent sur les cellules de la granulosa ou inversement. Ces facteurs de croissances agissent de manière paracrine. Ils ont pour certains été décrits précédemment et les membres de la famille du TGF- β impliqués dans ce processus seront énumérés dans un chapitre ultérieur (page 85).

Croissance folliculaire terminale

FSH dépendante

Croissance folliculaire basale

FSH indépendante

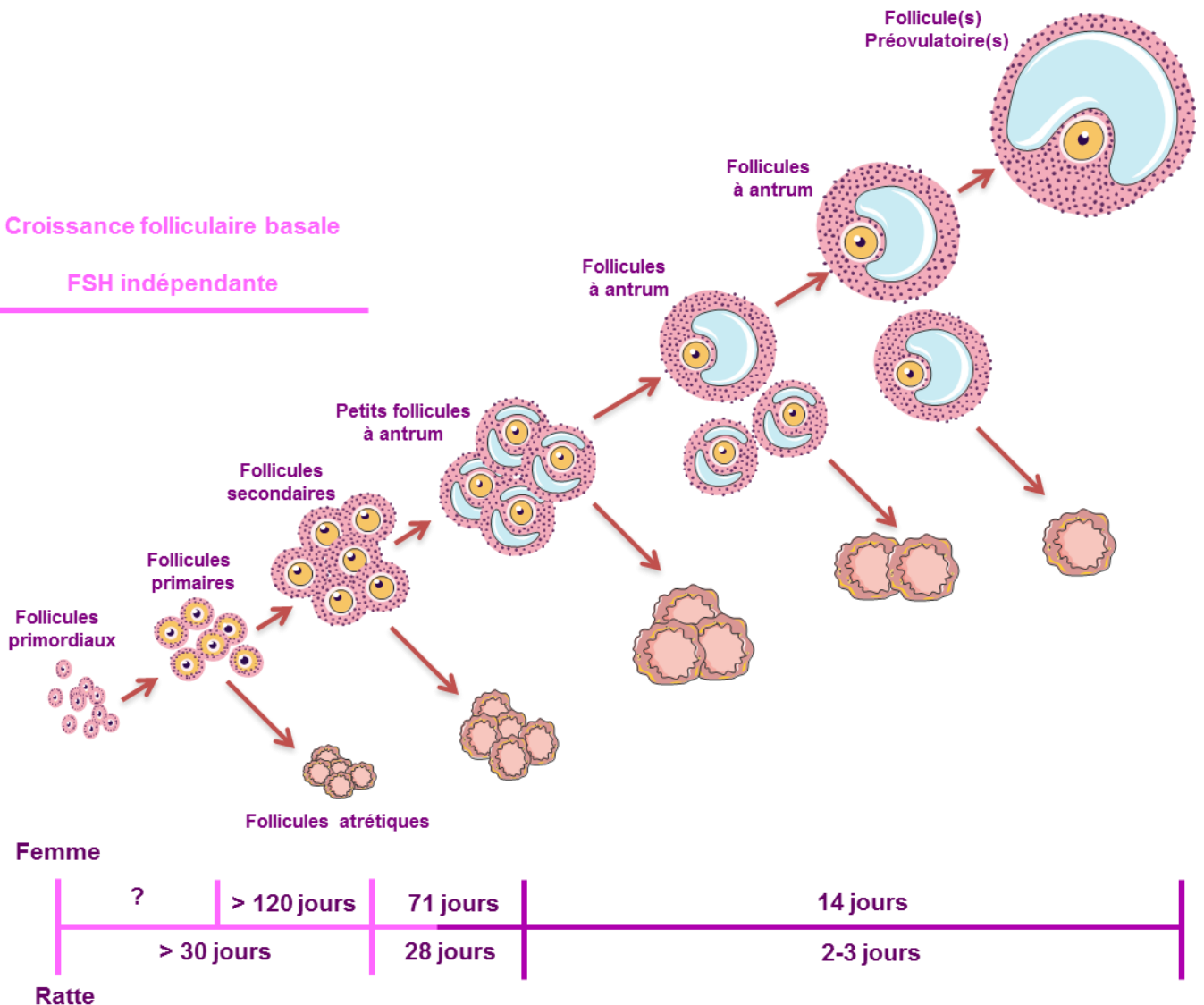


Figure 8 : Durée du recrutement et de la sélection folliculaire chez la femme et la ratte. Chez la femme, il faut plus de 120 jours pour que le follicule primordial atteigne le stade secondaire et 71 jours supplémentaires pour qu'il devienne antral. Chez la ratte, il faut environ 60 jours pour atteindre ce stade. Le recrutement folliculaire basal ne nécessite pas la présence de gonatrophines telle que la FSH. Ce recrutement basal s'arrête au stade préantral chez les rongeurs et au stade petit follicule à antrum chez la femme. Les follicules les plus sensibles à la FSH vont être sélectionnés et continuer leur croissance. Les autres vont rentrer en apoptose, c'est l'atrésie folliculaire. Suite au recrutement cyclique, il faut seulement 14 jours chez la femme et 2 à 3 jours chez la ratte pour obtenir un (ou plusieurs) follicule mûr (McGee and Hsueh 2000).

3.2 La croissance folliculaire terminale

a Sélection du follicule dominant

La croissance folliculaire terminale est strictement dépendante de la présence de FSH, et pour les stades terminaux de la maturation du follicule préovulatoire, de la présence de LH. Cette phase est beaucoup plus rapide que la précédente. Elle ne dure que 2 à 3 jours chez les rongeurs et 14 chez la femme (McGee and Hsueh 2000) (figure 8). Le suivi de la croissance folliculaire suggère que, chez presque toutes les espèces, la folliculogénèse terminale s'active quand la phase lutéale se termine, c'est-à-dire quand le corps jaune régresse. Les follicules recrutés forment alors une cohorte qui comprend plusieurs follicules de sensibilités différentes aux gonadotropines. Une sélection se produit alors et la taille de la cohorte est réduite au nombre d'ovulations caractéristique de la race ou de l'espèce. Les follicules antraux non sélectionnés sont éliminés. Avant la puberté, tous les follicules antraux vont dégénérer, l'individu n'étant pas encore apte à assurer l'ovulation et la gestation. Le follicule (ou les follicules pour les espèces poly-ovulantes) destiné à ovuler, est reconnaissable par sa taille. Il est plus gros que les autres et est appelé « follicule dominant ». Deux niveaux de régulation entrent en jeu : les régulations endocrines (FSH et LH) et les régulations locales. Chez les primates comme chez les mammifères domestiques, la FSH constitue le signal endocrine impliqué dans le recrutement. Chaque individu présente un niveau seuil de FSH en dessous duquel le recrutement n'est pas induit. Des variations faibles de FSH autour de ce seuil déclenchent ou non le recrutement. On peut noter l'importance du facteur IGF-1 qui régule positivement l'expression du récepteur de la FSH (Zhou, Kumar et al. 1997) et qui pourrait donc jouer un rôle majeur dans le phénomène de sélection folliculaire. Le follicule dominant recruté va continuer à grossir pour devenir pré-ovulatoire. Ce follicule, encore appelé follicule mûr ou de Graff, présente des récepteurs de la FSH sur les cellules de la granulosa et des récepteurs de la LH sur les cellules de la granulosa et de la thèque. Les femmes portant une mutation sur le gène codant la sous unité β de la LH ou de son récepteur, n'atteignent pas l'ovulation (Arnhold, Lofrano-Porto et al. 2009). Au 14^{ème} jour du cycle chez la femme, une décharge de LH et de FSH va provoquer, la reprise de la méiose et l'ovulation.

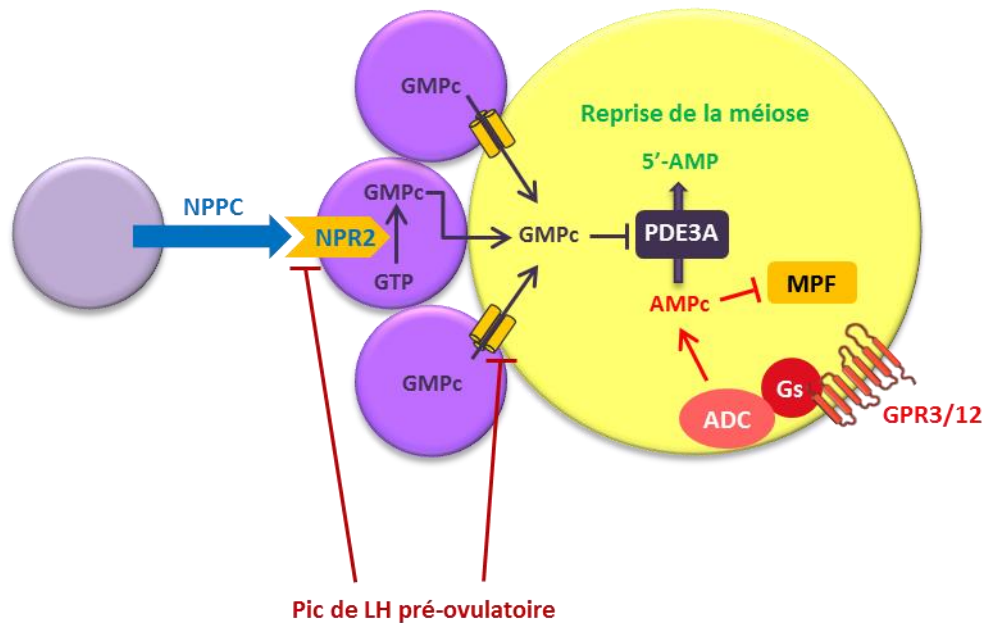


Figure 9 : Contrôle de la reprise de la méiose pré-ovulatoire. L'AMPc et le GMPc ovocytaire empêche la reprise de la méiose. L'AMPc maintient le MPF inactif et le GMPc inhibe la PDE3A qui permet la conversion de l'AMPc en une forme inactive. C'est la décharge ovulante de LH qui va permettre la reprise de la méiose. En effet, le pic de LH va diminuer l'action du récepteur NPR2, ce qui va diminuer la production de GMPc. Le pic de LH va également induire la fermeture des jonctions gap inhibant le passage du GMPc dans l'ovocyte. La diminution des concentrations de GMPc dans l'ovocyte va permettre l'activation de la PDE3A, la conversion de l'AMPc en sa forme inactive, l'activation du MPF et la reprise de la méiose. Figure adaptée de (Zhang, Su et al. 2010)

b Reprise de la méiose ovocytaire

Au moment de l'ovulation, l'ovocyte doit finir la première division méiotique. Il est jusqu'à l'ovulation bloqué en prophase de première division. La reprise de la méiose se fait en réponse du pic pré-ovulatoire de LH (Mehlmann 2005). Le récepteur de la LH est présent sur les cellules de la granulosa murales mais absent des cellules du cumulus oophorus et de l'ovocyte lui-même. Les nucléotides cycliques, l'AMPc et le GMPc présentent un rôle crucial pour le maintien de l'arrêt méiotique. L'AMPc est produit dans l'ovocyte par l'activation des récepteurs GPR3 et GPR12 couplés à la protéine Gs (Hinckley, Vaccari et al. 2005). L'AMPc maintient le MPF (M-phase promoting factor) inactif via la phosphorylation de la kinase CDK1. La phosphodiesterase spécifique de l'ovocyte, PDE3A, s'active suite au pic de LH ce qui induit l'hydrolyse de l'AMPc en une forme inactive et initie la reprise méiotique. Plus récemment, il a été montré qu'un facteur produit par les cellules de la granulosa murales, le NPPC (Natriuretic peptide type C), agit sur son récepteur NPR2 (Natriuretic peptide receptor 2) sur les cellules du cumulus pour induire l'augmentation du GMPc. Le GMPc rejoint l'ovocyte via les jonctions gap et inhibe l'activité de la PDE3A dans l'ovocyte (Zhang, Su et al. 2010). La production de GMPc participe au maintien de la quiescence ovocytaire. Le pic de LH réduit l'activité du récepteur à activité guanylyl cyclase NPR2 ce qui induit la diminution de la production de GMPc (Robinson, Zhang et al. 2012). Le pic de LH induit également une augmentation de l'EGF (epidermal growth factor) ce qui a pour effet la fermeture des jonctions gap participant ainsi à la réduction de la concentration de GMPc dans l'ovocyte (Norris, Freudzon et al. 2010). Suite à la diminution des concentrations d'AMPc et de GMPc, la méiose reprend. Elle s'arrête en métaphase de seconde division et ne s'achèvera qu'à la fécondation (Figure 9).

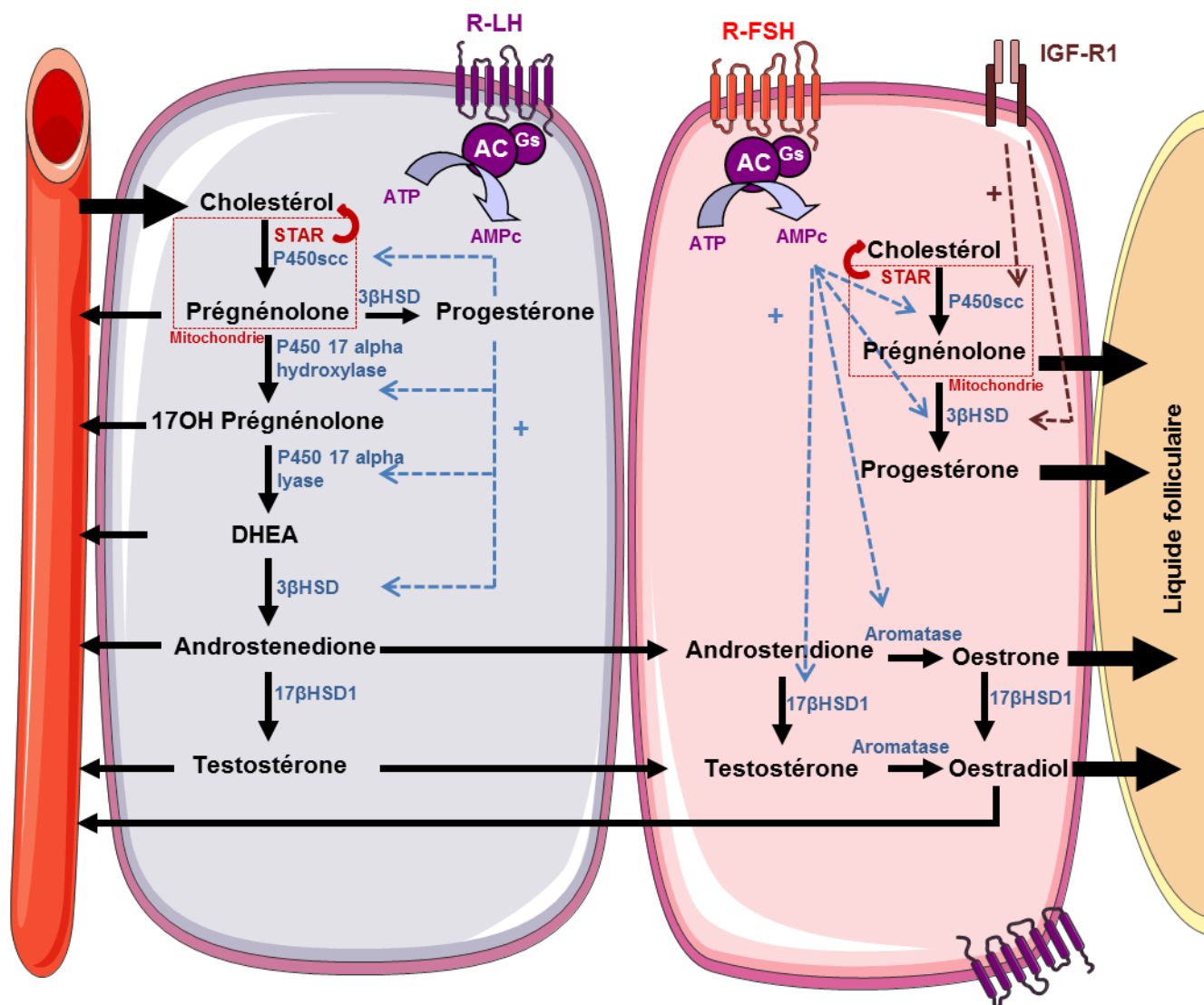
c Formation et régression du corps jaune

Une fois l'ovocyte expulsé, les cellules folliculaires se différencient en cellules lutéales et le follicule est alors appelé corps jaune (ou corpus luteum). Le corps jaune joue un rôle central dans la régulation du cycle oestrien et dans le maintien de la gestation. Cette fonction est assurée essentiellement par la progestérone qui est l'hormone principalement produite par le corps jaune. Si l'ovocyte n'est pas fécondé, le corps jaune régresse pour devenir fibreux, appelé alors corps blanc (corpus albicans) (Stocco, Telleria et al. 2007).

Le processus de lutéinisation commence par un arrêt du cycle cellulaire. Il a été montré que le pic de LH induisant l'ovulation permettait également d'arrêter le cycle des cellules de la granulosa entrant dans le processus de lutéinisation. Le pic de LH agit également sur de nombreux facteurs nécessaires à la lutéinisation tels que le récepteur de la progestérone (PR), la cyclooxygénase 2 (COX-2) ou encore EGR-1 (early growth response protein 1). Pour que le corps jaune se maintienne et assure sa fonction, des changements opèrent, notamment dans l'expression des récepteurs sur les cellules lutéales. Le récepteur de la FSH essentiel au cours de la folliculogénèse ne l'est plus au sein du corps jaune. Son expression diminue suite au pic de LH. L'expression du récepteur de la LH à l'inverse va augmenter tout comme celle du récepteur de la prolactine PRL-R. Chez les rongeurs, le récepteur de la prolactine est nécessaire à la mise en place de la gestation. Les souris KO pour la prolactine ou son récepteur présentent une diminution de la sécrétion de progestérone suivie d'une involution du corps jaune. Chez ces souris, la décidualisation utérine et l'implantation n'ont pas lieu (Horseman, Zhao et al. 1997; Ormandy, Naylor et al. 2003). Le corps jaune doit disparaître pour permettre le début d'un nouveau cycle. La cause de la régression du corps jaune est la diminution de la production de progestérone induite essentiellement par la prostaglandine F2 α (PGF2 α). Dans de nombreuses espèces incluant les rongeurs, la source de production majeure de PGF2 α est l'utérus. Les cyclooxygénases 1 et 2 (COX1 et COX2) augmentent en fin de gestation permettant d'accroître la synthèse de PGF2 α . Le corps jaune produit également PGF2 α . Tout comme dans l'utérus l'expression des prostaglandines F2 α augmente en fin de gestation dans le corps jaune. L'hypothèse admise est qu'un relargage utérin pulsatile de PGF2 α induirait l'augmentation de la production de cette prostaglandine dans le corps jaune. PGF2 α , accompagnée d'autres facteurs tels que le TNF α (tumor necrosis factor α) ou le FasL (Fas ligand), va induire l'apoptose des cellules lutéales.

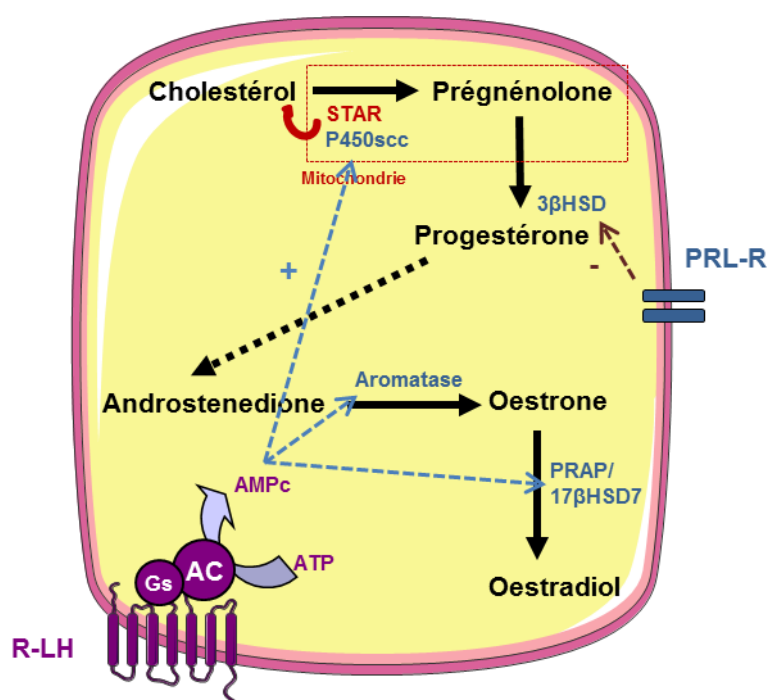
4 La synthèse des hormones stéroïdes dans l'ovaire adulte

Une des principales fonctions de l'ovaire est la stéroïdogénèse (Payne and Hales 2004). Les hormones stéroïdes sont synthétisées à partir de cholestérol. Ce cholestérol peut avoir plusieurs origines. La cellule peut utiliser le cholestérol circulant, le stocker sous forme d'ester de cholestérol dans des gouttelettes lipidiques ou encore le synthétiser *de novo* à partir d'Acetyl-coA. Le cholestérol circulant reste la source majoritaire.



THEQUE

GRANULOSA



LUTEALE

Figure 10 : Biosynthèse des stéroïdes dans l'ovaire La synthèse des stéroïdes au sein du follicule nécessite la coopération de deux types de cellules: les cellules de la granulosa et les cellules de la thèque. Les cellules de la thèque répondent à une stimulation par la LH par la production d'androgènes (androstènedione et testostérone). Les androgènes sont convertis en oestrogènes dans les cellules de la granulosa sous l'action de la FSH. En fin de phase folliculaire, les cellules de la granulosa expriment les récepteurs pour la LH ce qui permet l'augmentation de la production d'oestrogènes. Les cellules lutéales produisent majoritairement de la progestérone mais possèdent les enzymes nécessaires à la synthèse d'androgènes et d'oestrogènes.

Le cholestérol, présentant des propriétés hydrophobes, ne peut pas diffuser passivement à travers la membrane plasmique. Il est lié à des protéines de transport. Parmi elles, on peut citer SCP2 (sterol carrier protein 2). Une fois dans la cellule, le cholestérol est conduit à la membrane mitochondriale externe qu'il va traverser grâce, entre-autres, à la StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (Stocco 2001). Dans la mitochondrie, plus précisément au niveau de la membrane interne, la conversion du cholestérol va débuter.

4.1 Collaboration entre cellules de la granulosa et cellules de la thèque

Le follicule ovarien contient deux types de cellules stéroïdogènes, les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa. Elles diffèrent par leur équipement enzymatique (figure 10). Les deux types cellulaires possèdent les enzymes nécessaires à la conversion du cholestérol en progestérone (StAR, P450_{scc} et 3 β HSD). En revanche, les cellules de la granulosa sont dépourvues des enzymes permettant de synthétiser les androgènes (androstenedione et testostérone) précurseurs de la synthèse des oestrogènes (oestrone et oestradiol). Les cellules de la thèque assurent la production des androgènes, que les cellules de la granulosa importent pour synthétiser les œstrogènes.

C'est l'absence de cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17–20 lyase (*Cyp17a1*) dans les cellules de la granulosa qui les empêche de produire les androgènes nécessaires à la synthèse des oestrogènes (Le Goascogne, Sananes et al. 1991; Pelletier, Li et al. 2001). Cependant, la prégnenolone et la progestérone qu'elles synthétisent peuvent diffuser vers les cellules de la thèque, où elles peuvent être métabolisées en précurseurs pour l'aromatase (*Cyp19a1*). Les cellules de la thèque à l'inverse n'expriment pas l'aromatase (*Cyp19a1*) mais sont capables via l'activité du cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17–20 lyase (*Cyp17a1*) de convertir la prégnénolone en DHEA (déhydro-épiandrostérone). La DHEA est ensuite transformée en androstènedione et en testostérone qui sont les métabolites transformés en œstrogènes dans les cellules de la granulosa. Bien qu'elle ne puisse pas synthétiser d'androgène, la cellule de la granulosa peut, grâce à l'activité de la 17 β -HSD1, transformer l'androstènedione en testostérone. Cette même enzyme permet la conversion de l'oestrone en œstrogène.

4.2 Stéroïdogénèse dans le corps jaune

Une fois lutéinisées, les cellules de la granulosa du corps jaune présentent une expression enzymatique différente. Elles synthétisent alors essentiellement de la progestérone et les enzymes impliquées dans la synthèse de cette hormone (StAR, P450_{scc}, 3 β HSD) présentent une augmentation importante de leur expression (Stocco, Telleria et al. 2007). La quantité de progestérone dans le corps jaune dépend de la production intrinsèque mais également de l'expression de l'enzyme 20 α HSD qui convertit la progestérone en 20 α HSP, physiologiquement inactive. Une fois cette enzyme activée à l'approche de la parturition, la progestérone est majoritairement sous forme inactive ce qui participe au processus de régression du corps jaune. Chez la femme et les rongeurs, le gène *Cyp19a1* codant pour l'aromatase s'exprime mais pas le gène *Hsd17 β 1*. L'aromatase permet la conversion de l'androstènedione en estrone mais l'absence de la 17 β -HSD1 empêche la synthèse de testostérone. Dans les cellules de la granulosa folliculaire, la 17 β -HSD1 permet également de convertir l'estrone en œstrogène. Dans les cellules lutéales, c'est la PRAP/17 β -HSD7 qui effectue cette transformation (figure 10).

4.3 Régulation de la stéroïdogénèse

La voie de synthèse des stéroïdes est affectée par de multiples signaux extracellulaires dont les gonadotrophines. Les cellules de la thèque et les cellules lutéales expriment les récepteurs pour la LH et les cellules de la granulosa expriment ceux pour la FSH. La LH et la FSH, en se liant à leurs récepteurs couplés aux protéines Gs, induisent l'augmentation de l'AMPc intracellulaire via l'activation de l'adénylate cyclase. Cette augmentation d'AMPc permet d'accroître l'expression des enzymes CYP (*Cyp11a1*, *Cyp17a1* et *Cyp19a1*) (Payne and Hales 2004). IGF-1 agit en synergie avec la FSH pour augmenter l'expression de *Cyp11a1*. La FSH et la LH permettent également d'augmenter l'expression de l'enzyme 3 β HSD (deMoura, Choi et al. 1997 ; Martel, Gagne et al. 1994). Seul ou en synergie avec la FSH, il a été montré que le facteur IGF-1 pouvait aussi accroître l'expression de la 3 β HSD. La prolactine en revanche décroît l'expression et l'activité de cette enzyme in vitro (Martel, Gagne et al. 1994). L'expression de la 17 β HSD1, enzyme spécifique des cellules folliculaires, est stimulée par la FSH dans les cellules de la granulosa.

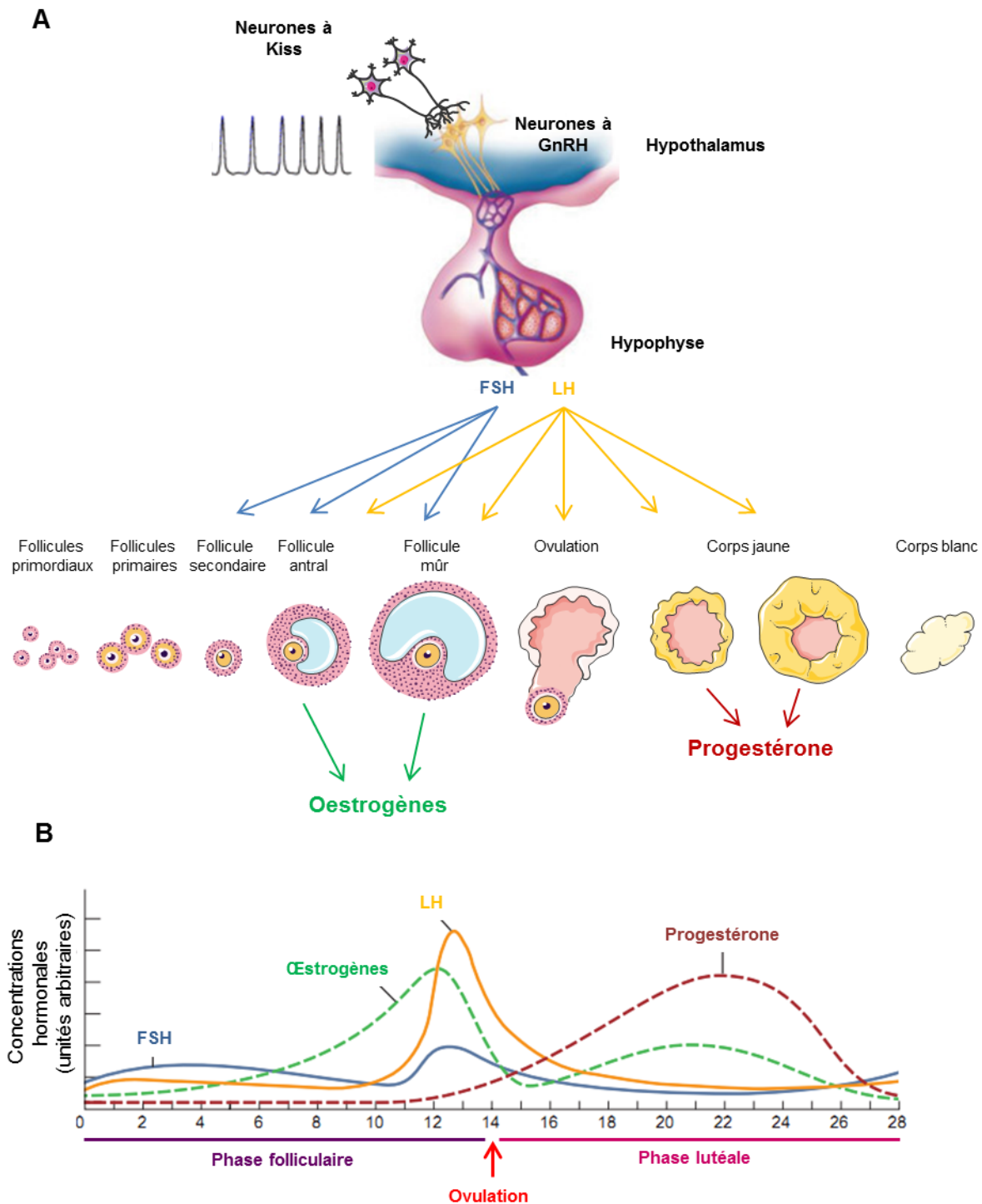


Figure 11 : L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. **A.** Le kiss-peptide sécrété par les neurones à kiss hypothalamique va réguler la production de GnRH. La sécrétion pulsatile de GnRH plus ou moins intense permet de faire varier la synthèse de FSH et de LH nécessaire à la cyclicité ovarienne. **B.** Les concentrations hormonales varient au cours du cycle. La concentration en oestrogènes va augmenter progressivement sous l'action de la FSH au cours de la phase folliculaire. En phase périovulatoire, la forte concentration en oestrogènes induit un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire nécessaire à la survenue du pic de LH et de l'ovulation. En phase lutéale, la concentration en oestrogènes diminue. La progestérone est alors l'hormone majoritairement produite au cours de cette phase.

Dans le corps jaune, la 17 β HSD1 n'est pas exprimée mais c'est la 17 β HSD7 qui permet la transformation de l'oestrone en œstrogène et qui peut être stimulée par la LH ou la prolactine pendant la première moitié de gestation chez le rat (figure 10). Pendant la première phase de la folliculogénèse, la phase de recrutement, la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa est stimulée par la FSH. Pendant la phase de dominance, les cellules de la granulosa ont acquis également des récepteurs pour la LH pour induire une augmentation de l'expression des enzymes nécessaires à la production des œstrogènes. Ceci enclenche une boucle de rétrocontrôle positif. Les œstrogènes ovariens vont aller stimuler l'expression de la LH hypophysaire ce qui a pour finalité de déclencher le pic de LH nécessaire à l'ovulation.

5 L'axe hypothalamo-hypophysaire : régulation de la fonction endocrine ovarienne

La fonction endocrine de l'ovaire est directement régulée par des acteurs de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HH). Le premier acteur impliqué dans la régulation de l'axe HH est le système kiss-peptide/GPR54. Le kiss-peptide est produit par des neurones spécialisés de l'hypothalamus et son récepteur GPR54 est exprimé sur les neurones produisant la GnRH (Gonadotrophine releasing hormone) (figure 11). Les souris KO pour le kiss-peptide présentent une anomalie de la folliculogénèse (d'Anglemont de Tassigny, Fagg et al. 2007). Celle-ci est stoppée au stade petit follicule à antrum. Ces souris sécrètent également moins de FSH et de LH hypophysaire. La diminution de la production de FSH expliquerait le blocage de la folliculogénèse. Jusqu'au stade pré-antral, la FSH n'est pas nécessaire à leur croissance. On peut noter qu'en absence d'un récepteur GPR54 fonctionnel, il n'y aura pas de survenue de la puberté que ce soit chez l'homme ou chez la souris (Seminara, Messenger et al. 2003). Ce système est donc essentiel à la mise en place de la fonction reproductrice. Le rôle du kiss-peptide est de réguler la sécrétion de GnRH (Pinilla, Aguilar et al. 2012). La GnRH est une neurohormone sécrétée au niveau de l'hypothalamus de façon pulsatile. Elle est acheminée jusqu'à l'hypophyse et contrôle la production des gonadotrophines, FSH et LH, au niveau des cellules gonadotropes. Ces deux hormones vont ensuite être relarguées dans la circulation sanguine pour atteindre l'ovaire, leur organe cible.

5.1 Phase préovulatoire

En début de phase folliculaire, les taux de FSH et de LH sont bas permettant cependant le recrutement d'une cohorte de follicules.

Les follicules immatures sécrètent peu d'oestrogènes. La faible concentration d'oestrogènes induit un rétrocontrôle négatif sur l'axe HH ce qui maintient les taux de FSH et de LH à un niveau bas. Les oestrogènes peuvent agir sur les neurones à Kiss ou à GnRH qui présentent les récepteurs nécessaires à cette réponse (Radovick, Levine et al. 2012). Les follicules antraux en croissance sont à différents stades de développement. Le faible niveau de FSH entraîne l'arrêt de la croissance des follicules présentant les besoins les plus importants en FSH. En phase préovulatoire, l'inhibine B participe également au rétrocontrôle négatif de la production de FSH.

5.2 Phase périovulatoire

A mesure que les follicules antraux grossissent, la concentration en oestrogènes augmente. Sous l'effet des oestrogènes ovariens, eux même stimulés par la FSH, va s'enclencher un rétrocontrôle positif sur l'axe HH. Les oestrogènes vont permettre d'activer les neurones à kiss ce qui va avoir pour conséquence d'augmenter la pulsativité de la GnRH. Les taux d'inhibine B vont également diminuer avant l'ovulation ce qui permet à l'activine d'exercer son rôle de régulateur positif de la sécrétion de FSH. L'augmentation des taux de FSH entraîne l'augmentation de la production d'oestrogènes. La finalité de l'augmentation de l'activité de l'axe HH est la sécrétion d'une grande quantité d'oestrogènes responsable de la décharge ovulante de LH (Wang and Yen 1975). Il a également été montré plus récemment que l'augmentation de la production de progestérone avant l'ovulation est nécessaire à la survenue du pic de LH. La progestérone serait produite au niveau du cerveau par les astrocytes suite à l'augmentation de la concentration oestrogénique (Micevych and Sinchak 2011). La progestérone diffuserait ensuite jusqu'aux neurones permettant d'augmenter la pulsativité de la GnRH.

5.3 Phase postovulatoire

Suite à l'ovulation, l'activité de l'axe HH diminue à cause d'une moindre production d'oestrogènes. Un pic d'inhibine est détectable peu après le pic de LH contribuant à la diminution de taux d'oestrogènes circulants. Cette diminution du taux d'oestrogènes rétablit le rétrocontrôle négatif (Welt, Pagan et al. 2003). Le corps jaune produit de la progestérone qui va également participer au rétrocontrôle négatif sur l'axe HH. La progestérone permet de maintenir les taux de FSH et de LH à un faible niveau pendant la seconde phase du cycle.

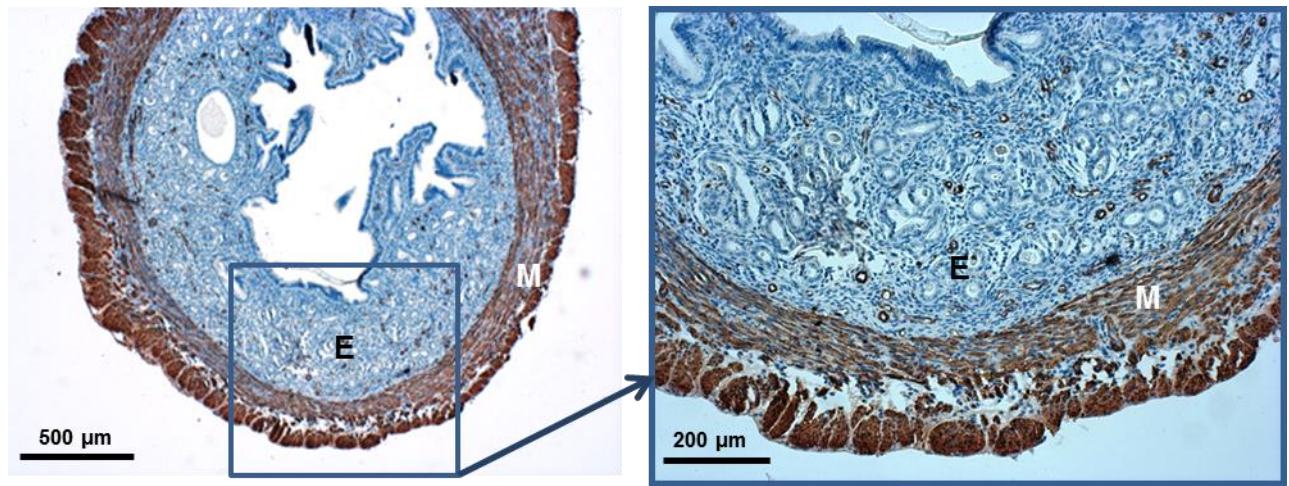


Figure 12: Histologie de l'utérus murin. L'utérus est formé de deux couches, l'endomètre et le myomètre. L'endomètre, qui est la couche centrale, va évoluer au cours du cycle et au cours d'une éventuelle gestation. Le rôle essentiel du myomètre, est de se contracter au moment de la parturition. Il s'agit de la couche extérieure marquée ici à l'aide de l'anticorps α -sma (smooth muscle actine). E: endomètre M: myomètre

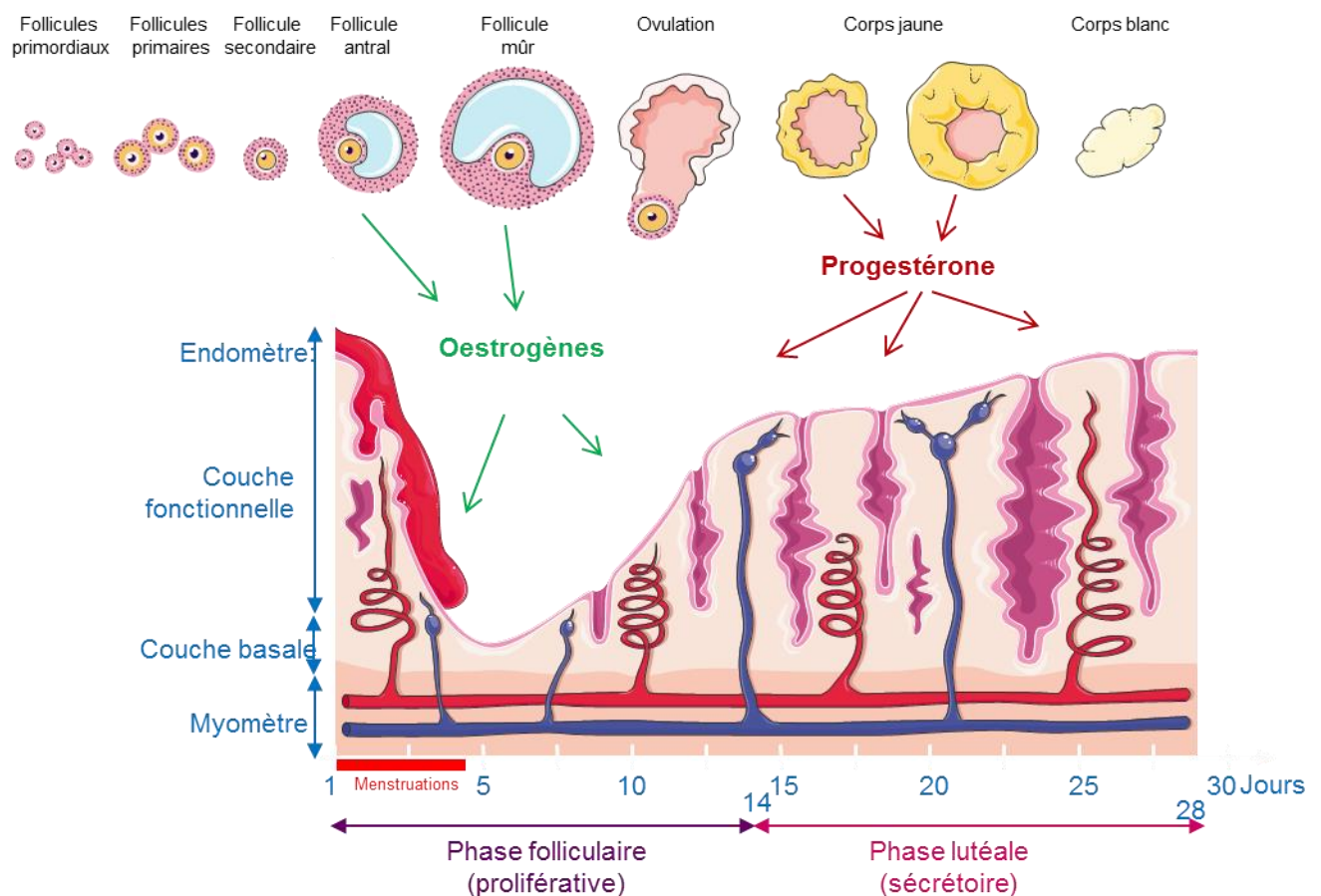


Figure 13: Régulation de la fonction utérine par les hormones ovariennes. En fin de phase folliculaire, les oestrogènes permettent à l'endomètre utérin de se développer progressivement. Suite à l'ovulation c'est la production de progestérone par le corps jaune qui prépare l'utérus à une éventuelle gestation. En l'absence de gestation, le corps jaune régresse et la partie supérieure de l'endomètre va être éliminée.

III Le cycle utérin

1 Morphologie

L'utérus est un organe qui se différencie à partir des canaux de Müller. La fonction principale de cet organe est de recevoir et d'héberger l'embryon, puis le fœtus, au cours de la grossesse. La morphologie de l'utérus varie chez les différentes espèces de mammifères. En effet, les canaux de Müller vont se souder à des endroits variables en fonction des espèces. Chez la femme, l'utérus est entièrement soudé et les cornes n'existent pas : il s'agit de l'utérus simplex. L'utérus de la souris présente deux cornes utérines séparées sur presque toute leur longueur et elles fusionnent en un corps utérin court, qui communique avec le vagin par un seul orifice. On parle d'utérus bipartite (Kobayashi and Behringer 2003). L'utérus est formé d'une muqueuse, l'endomètre, entourée de deux couches musculaires : une couche de fibres circulaires et une couche de fibres longitudinales. Ces deux dernières couches forment le muscle utérin ou myomètre (figure 12).

Le rôle majeur de cette couche est l'expulsion du fœtus en fin de gestation en réponse à des signaux hormonaux précis. La contraction du myomètre est également observable en période pré-ovulatoire puis cesse après l'ovulation. Cette couche de l'utérus ne se modifie pas au cours du cycle sexuel.

L'endomètre est la partie la plus interne de l'utérus. Il s'agit d'un tissu conjonctif bien vascularisé (stroma), bordé par un épithélium. C'est dans cette partie de l'utérus que l'implantation va avoir lieu. Au cours du cycle, l'endomètre subit des modifications morphologiques et fonctionnelles étroitement liées aux hormones sexuelles.

2 Modification au cours du cycle

Pendant la période génitale active, l'utérus subit des changements cycliques au niveau de l'endomètre (Mihm, Gangooly et al. 2011). En effet, la cyclicité de l'utérus est intimement liée à la cyclicité ovarienne. Les hormones ovariennes, œstrogènes et progestérone, jouent un rôle crucial dans la coordination des modifications de l'utérus. Les oestrogènes stimulent la prolifération cellulaire dans l'épithélium et le stroma de l'endomètre pendant la phase proliférative (figure 13).

Après l'ovulation, c'est essentiellement la progestérone produite par le corps jaune qui va permettre la prolifération et la différenciation des glandes endométriales. Si l'ovocyte n'a pas été fécondé, l'assise de l'endomètre n'a pas besoin de se maintenir. Le corps jaune régresse et la production de progestérone diminue. Il se produit alors une infiltration de lymphocytes qui vont détruire la matrice extra-cellulaire et faciliter la désagrégation de l'épithélium superficiel. Chez les femmes, la partie superficielle de l'endomètre est éliminée au cours des règles ce qui marque le début d'un nouveau cycle. Chez les rongeurs, cette partie de l'utérus est résorbée entre chaque cycle. Si l'ovocyte a été fécondé, le corps jaune va se mettre en place et perdurer. La muqueuse utérine se maintient alors à son maximum de développement grâce aux oestrogènes et à la progestérone. La progestérone produite par le corps jaune puis par le placenta permet également d'inhiber la contractilité myométriale. En fin de gestation chez la plupart des mammifères (rongeurs, brebis, vache, chèvre...), les taux plasmatiques de progestérone chutent pour permettre au muscle utérin de répondre aux signaux nécessaires à sa contraction (Snegovskikh, Park et al. 2006). Cette chute de la progestérone n'est pas observée chez la femme mais une diminution du ratio progestérone/oestradiol a été décrite au moment du terme. Chez toutes les espèces, le myomètre passe d'un environnement riche en progestérone pendant la gestation à un environnement riche en oestrogènes au moment de la parturition. La modification du rapport progestérone/oestradiol est favorable à l'action de certains facteurs nécessaires au déclenchement de la contractilité utérine. Les contractions myométriales sont essentiellement activées par l'ocytocine, une hormone produite par l'hypothalamus, et les prostaglandines PGE2 et PDF2 α , fabriquées par l'utérus. Ces facteurs transduisent leur signal via des récepteurs couplés aux protéines G α_q qui vont activer la PLC (Okawa, Suzuki et al. 1993). Ceci va induire l'augmentation du calcium intracellulaire nécessaire à la contraction musculaire. Les signaux impliqués dans la parturition diffèrent selon les espèces et actuellement ce processus n'est que partiellement compris.

La mise en place du tractus génital femelle pendant la vie fœtale et la régulation fine des fonctions ovariennes et utérines à l'âge adulte sont nécessaires pour permettre aux espèces de se reproduire. De nombreux facteurs régulent la fonction reproductrice. Le rôle de certains d'entre eux a été traité dans la première partie de cette introduction. L'hormone anti-Müllérienne agit sur la fonction reproductrice en exerçant notamment une régulation négative sur la folliculogénèse. L'étude du mode d'action et des rôles de l'AMH dans le tractus génital femelle a fait l'objet de mon travail de thèse.

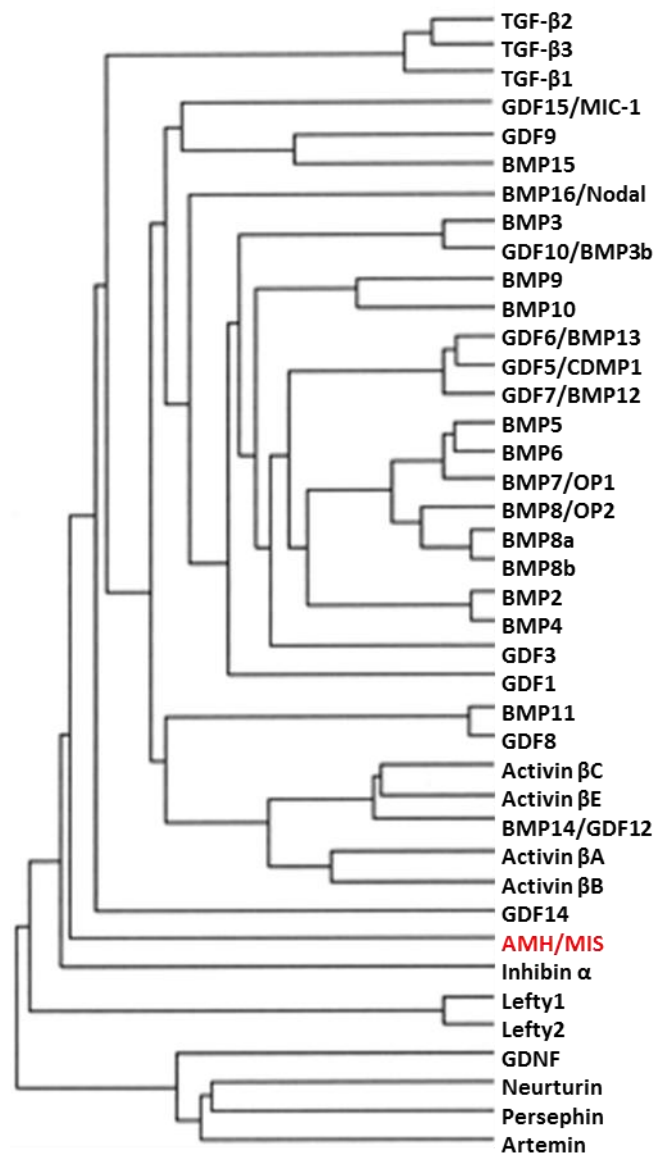


Figure 14 : Les sous-classes de la superfamille du TGF-β. La superfamille du TGF-β est composée de plusieurs sous-familles. On peut distinguer la sous-famille des BMP (Bone Morphogenetic Protein), de l'activine, des GDF (Growth Differentiation Factor) et du TGF-β (Chang, Brown et al. 2002).

Cette hormone fait partie de la famille du TGF- β . La voie de signalisation des membres de cette famille ainsi que leurs rôles sur la fonction reproductrice seront détaillés dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

IV Les membres de la famille du TGF- β

Le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) appartient à une grande famille d'une trentaine de membres dont les différentes isoformes du TGF- β , les BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*), les différentes sous-unités de l'activine, l'inhibine α ou encore l'hormone anti-Müllérienne (AMH) (figure 14). Cette superfamille est impliquée dans un large spectre de réponses biologiques comme le développement embryonnaire, la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse, la réparation tissulaire, la différenciation et le contrôle de la croissance cellulaire (Roberts 1998). Cette famille tient également une place importante dans la régulation de la fonction reproductrice. Une dérégulation de la signalisation du TGF- β induit des anomalies au cours du développement embryonnaire et intervient dans différentes pathologies humaines, telles que le cancer, la fibrose tissulaire ou encore des maladies auto-immunes. La réponse cellulaire au TGF- β est initiée par la fixation de celui-ci à des récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinase qui activent en aval les facteurs de transcription de la famille Smad (Massague and Gomis 2006 ; Massague 2012).

1 Voie de signalisation générale des membres de la famille du TGF- β

Le TGF- β , comme les autres membres de la famille, initie son signal par la liaison à un récepteur sérine/thréonine kinase de type II. Ceci induit le recrutement et la phosphorylation d'un récepteur de type I. La liaison du ligand sur son récepteur ou l'activation de celui-ci peut également nécessiter la présence de co-récepteurs. La propagation du signal se poursuit ensuite par le recrutement et la phosphorylation de protéines Smad. Une fois activées suite à leur phosphorylation, les Smads vont transloquer dans le noyau et en association avec des facteurs de transcription, réguler les gènes cibles du TGF- β .

	Betaglycan	Cripto	Endoglin	CD109	RGMa,b et c
TGF- β 1	+ (1)		++ (7)	++ (11)	
TGF- β 2	++ (1)				
TGF- β 3	+ (1)		++ (7)		
Inhibine	++ (2)				
Activine			+ (8)		
Nodal		++ (4)			
GDF1		++ (5)			
GDF3		++ (6)			
GDF5	+ (3)				
BMP2	+ (3)		+ (8)		++ (12,13,14,15)
BMP4	+ (3)				++ (13,14,15)
BMP6					++ (15)
BMP7	+ (3)		+ (8)		
BMP9			++ (9)		
BMP10			++ (10)		
BMP12					+ (12)
AMH					?

Tableau 3 : Les corécepteurs de la famille du TGF- β . En supplément des récepteurs de type I et II, il existe également des corécepteurs pour les membres de la famille du TGF- β . Il existe 4 types de corécepteurs: le betaglycan, cripto, endoglin et les RGM (repulsive guidance molecule). Les corécepteurs ont pour la plupart un rôle de présentation du ligand aux récepteurs de types I et II.

- (1) (Lopez-Casillas, Wrana et al. 1993)
- (2) (Lewis, Gray et al. 2000)
- (3) (Kirkbride, Townsend et al. 2008)
- (4) (Yeo and Whitman 2001)
- (5) (Cheng, Olale et al. 2003)
- (6) (Chen, Ware et al. 2006)
- (7) (Cheifetz, Bellon et al. 1992)
- (8) (Barbara, Wrana et al. 1999)
- (9) (Nolan-Stevaux, Zhong et al. 2012)
- (10) (Castonguay, Werner et al. 2011)
- (11) (Bizet, Liu et al. 2011)
- (12) (Halbrooks, Ding et al. 2007)
- (13) (Babitt, Zhang et al. 2005)
- (14) (Samad, Rebbapragada et al. 2005)
- (15) (Xia, Babitt et al. 2008)

1.1 Les corécepteurs ou récepteurs de type III

a Betaglycan

Le betaglycan a été identifié à l'origine comme un corécepteur de la famille du TGF- β mais n'intervenant pas directement dans la signalisation de ses membres. Sa fonction avait été décrite comme étant principalement une fonction de présentation du ligand. Il a été montré que le betaglycan régula la liaison de l'inhibine A à son récepteur de type II (Lewis, Gray et al. 2000). Au cours de la dernière décennie, d'autres fonctions du betaglycan ont été établies ne limitant plus ce dernier à une molécule accessoire nécessaire à la liaison du TGF- β ou de l'inhibine à leurs récepteurs. Le betaglycan est le membre de la voie de signalisation du TGF- β le plus exprimé dans de nombreux types cellulaires. Bien que son affinité pour le TGF- β soit plus faible que les autres récepteurs de type I et II, la présence du betaglycan augmente la liaison du TGF- β à ses récepteurs et de surcroît augmente la réponse cellulaire (Lopez-Casillas, Wrana et al. 1993). Cet effet est plus prononcé pour le TGF- β 2 qui ne se lie que faiblement à ses récepteurs en absence du betaglycan. Le betaglycan est également connu pour lier l'inhibine avec une haute affinité et l'action de l'inhibine est potentialisée par la liaison au betaglycan (Lewis, Gray et al. 2000). Le betaglycan forme un complexe stable avec l'inhibine et le récepteur de type II de l'activine réduisant de ce fait la signalisation et les effets de l'activine. En plus de la liaison aux TGF- β s et à l'inhibine, il a récemment été montré que le betaglycan pouvait lier directement BMP2, 4, 7 et le GDF5, ayant un impact direct sur la signalisation de ces protéines (Kirkbride, Townsend et al. 2008) (tableau 3).

Le betaglycan a le potentiel d'influencer divers processus cellulaires et aurait des rôles essentiels dans le développement embryonnaire. En effet, les souris KO *Tgfb3* codant pour le betaglycan meurent précocement à 14,5 jpc présentant des défauts majeurs de développement cardiaque et aortique (Compton, Potash et al. 2007). Le betaglycan joue également un rôle important dans la fonction reproductrice. De nombreuses études montrent que le betaglycan est requis pour l'action régulatrice des inhibines sur l'expression de la FSH au niveau de l'hypophyse. En effet, l'inhibition de l'expression du betaglycan empêche l'inhibine A de réguler négativement la production de FSH (Wiater, Lewis et al. 2009).

Le rôle du betaglycan comme corécepteur des inhibines est particulièrement important pour la régulation de l'axe reproducteur femelle aux vues du grand nombre de pathologies dues à une

altération de l'expression du betaglycan chez l'Homme et les rongeurs.

Le betaglycan et les inhibines présentent en plus de leur rôle au niveau de l'hypophyse, une action locale au niveau de l'ovaire. Dès leur différenciation, les cellules de la granulosa expriment le betaglycan. Cette expression est retrouvée ensuite dans les cellules de la thèque et augmente avec la maturation folliculaire. En accord avec son expression dans les cellules folliculaires, l'altération de l'expression du betaglycan est associée à de nombreuses pathologies chez l'Homme. Dans le cancer des cellules de la granulosa, on observe une extinction de l'expression du betaglycan et, de ce fait, une sensibilité réduite aux TGF- β et à l'activine (Bilandzic, Chu et al. 2009). Une autre pathologie, l'insuffisance ovarienne précoce, est associée à des mutations du gène codant pour l'inhibine A ou à des mutations du domaine de liaison du TGF- β /inhibine du betaglycan (Dixit, Rao et al. 2006). Dans le syndrome des ovaires polykystiques, on observe à l'inverse une surexpression du betaglycan associée à des dérégulations hormonales (Zhu, Zhou et al. 2010). Bien que des dérégulations du betaglycan soient impliquées dans certaines pathologies ovariennes, le rôle précis de celui-ci dans cet organe est encore inconnu.

Récemment, le betaglycan a été identifié comme étant un suppresseur de tumeur dans de nombreuses lignées cellulaires humaines. En effet, la perte d'expression du betaglycan empêche le contrôle de la croissance et de la migration cellulaire par le TGF- β et l'inhibine. Plusieurs études montrent que les cellules cancéreuses présentent une diminution de l'expression du betaglycan corrélée à une augmentation de la migration cellulaire, de l'angiogenèse et donc de la progression tumorale. Cette corrélation est particulièrement forte dans le cancer de l'ovaire. Dans le cancer des cellules de la granulosa ovarienne, la surexpression du betaglycan rétablit la réponse au TGF- β et à l'inhibine ce qui régule l'adhésion cellulaire, la migration et l'invasion (Bilandzic, Chu et al. 2009).

b ***Cripto***

Nodal, GDF1 et GDF3 utilisent les mêmes récepteurs de type I et II que l'activine pour transduire leurs signaux. Cependant, à la différence de l'activine, ils nécessitent également le recrutement du corécepteur Cripto. Cripto est une petite protéine accrochée à la membrane par un groupement glycoposphatidylinositol. Certaines études ont montré que Nodal, GDF1 et 3 se liaient à Cripto pour pouvoir ensuite se lier aux récepteurs de type I et II de l'activine (Yeo and Whitman 2001 ; Cheng, Olale et al. 2003 ; Chen, Ware et al. 2006). Cripto est

connu comme étant un régulateur de la signalisation de certains membres de la famille du TGF- β . En effet, il a été décrit que ce corécepteur pouvait atténuer la signalisation de l'activine A d'une part ou augmenter la signalisation de Nodal d'autre part (Gray and Vale 2012) (tableau 3).

Ce corécepteur joue des rôles essentiels dans le maintien et la différenciation des cellules souches ou encore dans la régulation de la croissance de certains tissus chez l'adulte. Cripto est également impliqué dans le développement embryonnaire des vertébrés. En effet, la souris KO pour *Cripto* présente un défaut dans la formation du mésoderme et donc une létalité embryonnaire (Ding, Yang et al. 1998). Bien que son expression soit plus importante pendant la vie embryonnaire, Cripto est également exprimé chez l'adulte dans la glande mammaire, l'endomètre, le pancréas ou encore le tissu adipeux. En complément de ces rôles physiologiques pendant le développement embryonnaire, Cripto est aussi impliqué dans la tumorigenèse. Il est exprimé très fortement chez l'Homme dans les cancers de l'ovaire, de l'endomètre, du testicule, du sein, du colon, de la vessie, de l'estomac, des poumons ou encore de la prostate alors qu'il est exprimé de façon négligeable dans les organes sains (Saloman, Bianco et al. 2000). Cripto présente les caractéristiques d'un oncogène. Il promeut la croissance et la prolifération cellulaire, la survie, la migration, l'invasion et l'angiogenèse (Strizzi, Bianco et al. 2005). Une administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre Cripto permet de réduire efficacement les xénogreffes tumorales chez la souris. Ceci permet d'envisager de prochaines thérapies chez l'homme.

c* *Endoglin

Endoglin est une glycoprotéine transmembranaire proche structuralement du betaglycan et connu pour être un corécepteur de plusieurs membres de la famille du TGF- β . Cette protéine peut se lier à l'activine A, à BMP 2, 7, 9 et 10 ou encore aux isoformes 1 et 3 du TGF- β (Cheifetz, Bellon et al. 1992 ; Barbara, Wrana et al. 1999 ; Nolan-Stevaux, Zhong et al. 2012 ; Castonguay, Werner et al. 2011) (tableau 3). Endoglin lie les ligands solubles et permet de réguler la liaison aux récepteurs de types I et II. Tout comme le betaglycan, endoglin ne présente pas d'activité kinase et n'a donc pas de rôle dans la transmission du signal.

Endoglin (*Eng*) est essentiellement connue pour son rôle sur le remodelage vasculaire et l'angiogenèse. En effet, *Eng* est le gène muté dans le syndrome de Rendu-Osler ou télangiectasie hémorragique héréditaire (McAllister, Grogg et al. 1994). De plus, les souris

KO pour *Eng* meurent à la moitié de la gestation du fait d'un défaut d'angiogenèse (Lopez-Novoa and Bernabeu 2010). De nombreuses études montrent qu'endoglin présenterait des rôles importants dans l'angiogenèse tumorale et pourrait d'ailleurs servir de marqueur pour évaluer la progression de certains cancers.

Dans la fonction reproductrice femelle, endoglin joue un rôle dans la survenue de la pré-éclampsie. En effet, il existe une forme soluble d'endoglin qui serait nettement augmentée chez les femmes présentant cette pathologie (Rana, Cerdeira et al. 2012). Des études sont en cours pour permettre de détecter la survenue de la pré-éclampsie par un dosage de cette protéine.

***d* CD109**

CD109 est une protéine accrochée à la membrane par un groupement glycophosphatidylinositol. La souris KO *Cd109* a été générée et elle présente une hyperplasie des cellules épidermiques et des glandes sébacées (Mii, Murakumo et al. 2012). CD109 a été décrit comme un co-récepteur de la famille du TGF- β dans les kératinocytes (Finnson, Tam et al. 2006). Par des expériences de gain et de perte de fonction, les auteurs ont montré que CD109 agissait comme un modulateur négatif de TGF- β 1 dans ce type cellulaire. CD109 joue également un rôle dans l'internalisation et la dégradation des récepteurs ce qui permet de réguler le signal du TGF- β (Bizet, Liu et al. 2011). Une surexpression de CD109 à la surface des kératinocytes pourrait expliquer une internalisation trop importante des récepteurs du TGF- β et une diminution du signal qui font partie des symptômes observés dans le psoriasis (Litvinov, Bizet et al. 2011).

e Repulsive guidance molecule (RGM)

Les Repulsive guidance molecule, encore appelées RGMs, sont les premières molécules décrites comme étant des corécepteurs spécifiques des BMPs (Corradini, Babitt et al. 2009). Actuellement, 4 membres de cette famille ont été décrits chez les vertébrés : RGMa, RGMb (DRAGON), RGMc (hemojuvelin ou HJV) et RGMd (exprimés uniquement chez le poisson). La première description d'un membre de cette famille a été réalisée sur l'embryon de poulet en 2002 (Monnier, Sierra et al. 2002). Dans cette étude, une glycoprotéine membranaire exprimée dans le tectum optique a été clonée. Cette protéine empêche la croissance axonale dans le tectum optique et induit la redirection de ces axones vers une autre région. Cette protéine a donc été appelée Repulsive guidance molecule du fait de son rôle chemo-répulsif sur le guidage de la croissance axonale.

Les RGM sont des protéines liées à la membrane par un groupement glycophosphatidylinositol. Ces corécepteurs modulent la signalisation des BMPs via une interaction avec un récepteur de type II (ActR-II et BMPR-II) et un récepteur de type I (BMPR-IA et BMPR-IB) induisant la phosphorylation des Smad1 5 et 8 intracellulaires.

- ***RGMa***

Le co-récepteur aux BMPs, RGMa, est exprimé dans l'hippocampe de souris en développement mais ne semble pas impliqué dans la guidance axonale au niveau de la rétine comme son homologue chez le poulet. En revanche, c'est un inhibiteur de la régénération axonale du système nerveux central chez les mammifères. RGMa est exprimée dans un grand nombre de tissus suggérant son implication dans d'autres processus que la guidance axonale. En plus du système nerveux central chez la souris en développement, RGMa est exprimée au niveau des poumons, de la cochlée, des intestins ou encore au niveau des membres. Chez la souris adulte, RGMa s'exprime dans le cœur, le cerveau, les poumons, le foie, la peau, le rein, les intestins ou encore le testicule. La souris KO pour *Rgma* présente un défaut de fermeture du tube neural (Niederkofler, Salie et al. 2004). La moitié des embryons KO pour *Rgma* présentent une exencéphalite ce qui montre que cette protéine est essentielle à la fermeture du tube neural. RGMa a également été décrit comme étant un facteur de survie cellulaire en inhibant l'activité pro-apoptotique de la néogénine. Ce facteur est aussi impliqué dans la différenciation neuronale (Corradini, Babitt et al. 2009). Il a été montré que RGMa pouvait lier essentiellement BMP2 et BMP4 mais pas BMP7 (Babitt, Zhang et al. 2005).

- ***RGMb***

RGMb (DRAGON) est exprimé très fortement dans le système nerveux central de la souris pendant la vie embryonnaire. Cette expression persiste dans certaines zones après la naissance, mais devient plus faible. RGMb est également exprimé dans de nombreux autres organes chez la souris adulte comme les os, le cœur, les poumons ou encore le foie. A la différence de RGMa, l'expression de RGMb est également décrite dans certains organes du tractus reproducteur. On peut citer le testicule, l'épididyme, l'ovaire ou l'utérus. RGMb pourrait donc avoir un rôle dans la fonction reproductrice chez le rongeur. En 2006, la souris KO pour *Rgmb* a été décrite. Ces souris meurent à 3 semaines sans défauts évidents des fonctions motrices ou du développement du système nerveux central (Mueller, Yamashita et al. 2006). De nombreuses études sont en cours pour déterminer les causes de la mort prématurée de ces souris.

Les souris KO *Rgmb* mourant jeunes, il n'a pas pu être déterminé si elles présentaient ou non des problèmes dans la fonction reproductrice. Tout comme RGMa, RGMb ne lie essentiellement que BMP2 et BMP4 (Samad, Rebbapragada et al. 2005).

- ***RGMc***

RGMc est plus connu sous le nom d'HJV (hemojuvelin). En effet, l'importance de ce co-récepteur a été mise en évidence chez les souris KO pour *Rgmc* qui présentent une hémochromatose (Huang, Pinkus et al. 2005). L'hémochromatose juvénile (hémochromatose de type 2) est la forme la plus précoce et la plus sévère d'hémochromatose héréditaire rare. Cette maladie débute avant l'âge de 30 ans et est caractérisée par une surcharge tissulaire en fer. Elle présente les symptômes caractéristiques de l'hémochromatose héréditaire mais est également caractérisée par une cardiomyopathie sévère et un hypogonadisme. L'hémochromatose juvénile est causée par des mutations du gène codant pour l'hémojuvéline (*HJV*) sur le chromosome 1 ou des mutations du gène codant pour l'hepcidine (*HAMP*) sur le chromosome 19. Ces mutations entraînent un déficit total ou majeur en hepcidine, qui est un peptide synthétisé majoritairement dans le foie et qui est le régulateur majeur du métabolisme du fer. Le rôle de RGMc sur le métabolisme du fer dans le foie a été largement décrit mais son expression a également été montrée dans le cœur et dans le muscle squelettique. Ses fonctions dans ces organes sont, à l'heure actuelle, inconnues (Corradini, Babitt et al. 2009). Il a été montré que les ligands du co-récepteur RGMc étaient essentiellement BMP2, BMP4 et BMP6 (Xia, Babitt et al. 2008).

Une étude récente a analysé l'expression des co-récepteurs aux BMPs, RGMa b et c dans des tissus et dans des lignées de cancer de la prostate (Li, Ye et al. 2012). RGMb et c sont plus exprimés que RGMa et semblent avoir un effet inhibiteur sur la croissance, l'adhésion et la motilité des cellules cancéreuses de la prostate.

1.2 Les récepteurs

Les récepteurs de type I et II sont des récepteurs transmembranaires. Ils comprennent 3 domaines distincts. Le domaine extracellulaire situé en N terminal est riche en cystéines dont trois forment la boîte cystéine (Wrana, Attisano et al. 1994). Le domaine transmembranaire est suivi du domaine intracellulaire. Ce dernier comprend trois sous-domaines : la boîte GS, le domaine kinase et la queue cytoplasmique.

Activin Like kinase	Autre nomenclature	Nom complet	Gène correspondant
ALK1	ActR-LI	Activin A receptor-like 1	<i>Acvr1l</i>
ALK2	ActR-IA	activin A receptor, type 1A	<i>Acvr1</i>
ALK3	BMPR-IA	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	<i>Bmpr1a</i>
ALK4	ActR-IB	activin A receptor, type 1B	<i>Acvr1b</i>
ALK5	TGFbR-I	transforming growth factor, beta receptor I	<i>Tgbr1</i>
ALK6	BMPR-IB	bone morphogenetic protein receptor, type 1B	<i>Bmpr1b</i>
ALK7	ActR-IC	activin A receptor, type IC	<i>Acvr1c</i>

Tableau 4 : Nomenclature des récepteurs de type I de la famille du TGF- β .

La boîte GS comprend 30 acides aminés très conservés et contient les sites de phosphorylation du récepteur I par le récepteur II. Le domaine kinase comprend les serine/threonine kinases qui vont permettre le recrutement et la phosphorylation des protéines Smad en aval (Massague 2012).

a Récepteurs de type I

Les récepteurs de type I de la famille du TGF- β sont appelés Activin Like Kinase (ALK). On compte 7 membres chez les mammifères : ALK1 (*Acvr1l*), ALK2 (*Acvr1*), ALK3 (*Bmpr1a*), ALK4 (*Acvr1b*), ALK5 (*Tg β rl*), ALK6 (*Bmpr1b*) et ALK7 (*Acvr1c*) (tableau 4, figure 15). Les récepteurs de type I possèdent une activité sérine/thréonine kinase dans leur domaine intracellulaire qui va permettre le recrutement et la phosphorylation des protéines Smad en aval (Massague and Gomis 2006). Les récepteurs de type I possèdent un domaine appelé GS sur leur région N-terminale intracellulaire qui est reconnue et phosphorylée par le récepteur de type II. En absence de ligand, la région GS est masquée inhibant ainsi l'activation du récepteur de type I. On peut citer la protéine FKBP12 qui voile la région GS du récepteur de type I en absence du ligand (Chen, Liu et al. 1997).

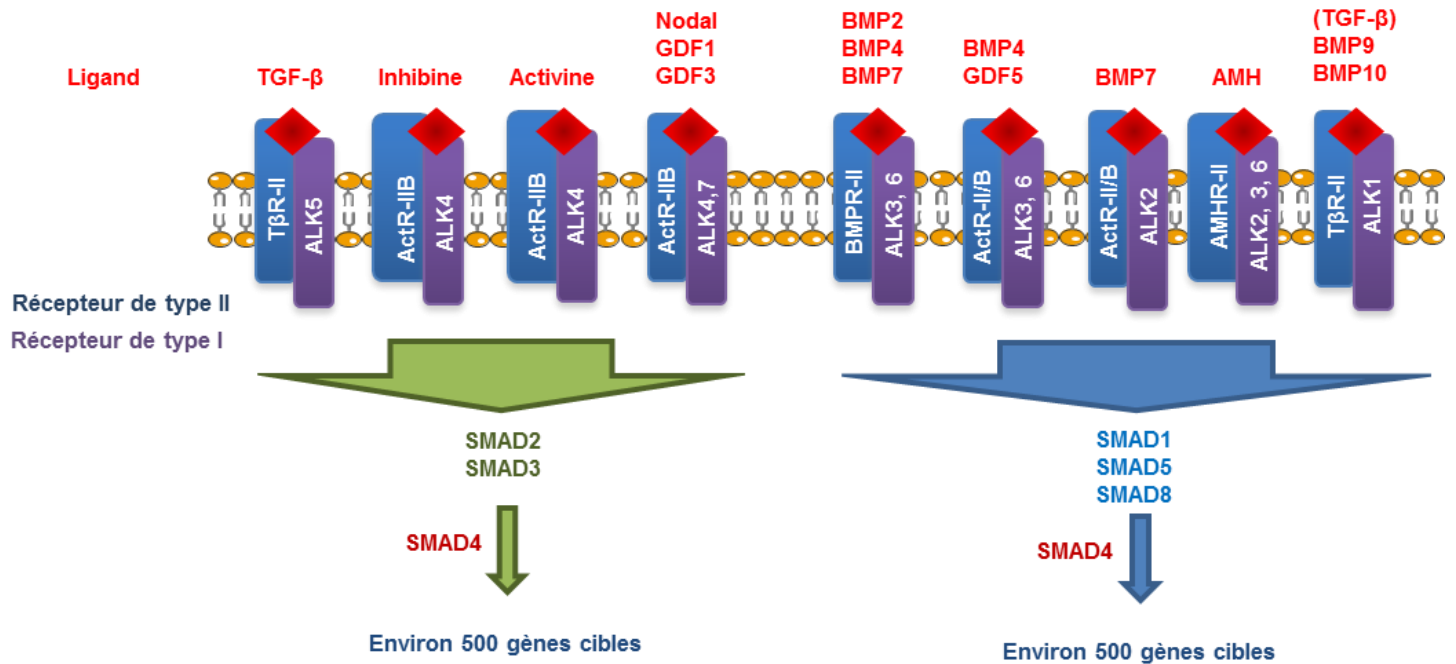
b Récepteurs de type II

Il existe 5 récepteurs de type II : les récepteurs aux activines, ActR-II et ActR-IIB, le récepteur aux TGF- β , T β R-II, le récepteur aux BMPs, BMPR-II et le récepteur à l'AMH, AMHR-II (figure 15). Les récepteurs de type II possèdent tout comme les récepteurs de type I une activité sérine/thréonine kinase intracellulaire. Ils peuvent donc recruter et phosphoryler les récepteurs de type I et déclencher la voie de signalisation induite par le ligand (Massague and Gomis 2006) (figure 15).

1.3 Les protéines Smad

Les protéines Smad sont des protéines d'environ 500 acides aminés impliquées dans la signalisation intracellulaire des membres de la famille du TGF- β . Chez l'Homme et la souris, il existe 8 protéines Smad alors qu'on en trouve seulement 4 chez la drosophile et 3 chez le ver *C. elegans* (Massague, Seoane et al. 2005).

A



B

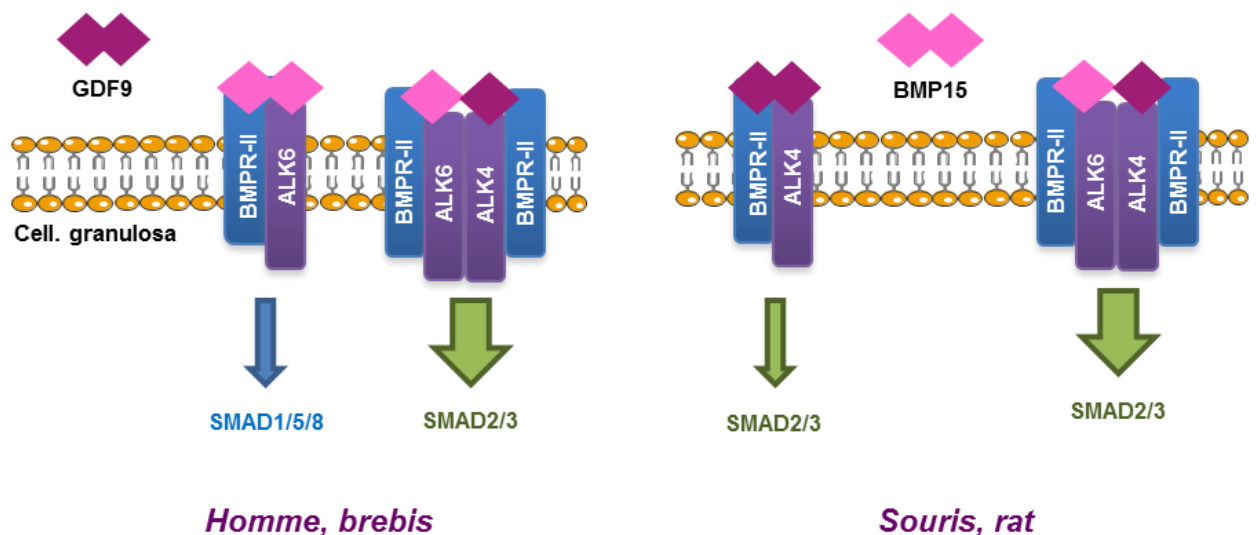


Figure 15 : Les récepteurs de la famille du TGF- β . **A.** Il existe 5 récepteurs de type II et 7 récepteurs de type I. Le TGF- β se lie à T β R-II et recrute ALK1 ou 5. Les activines et l'inhibine se fixent sur ActR-II/B recrutant ainsi ALK4. Nodal, GDF1 et Vg1 signalent via ActR-II/B et ALK4 ou 7. BMP2, 4 et 7 lient BMPRII ce qui recrute ALK3 et 6. BMP4 et GDF5 recrutent ActR-II et ALK3 et 6. Enfin, l'AMH se fixe sur son récepteur spécifique AMHR-II entraînant le recrutement d'ALK2, 3 ou 6. Il a récemment été montré que BMP9 et 10 pouvaient activer les Smad1/5/8 via ALK1 dans les cellules endothéliales (David, Mallet et al. 2007) Figure adaptée de (Massague and Gomis 2006). **B.** Une récente étude a montré que chez l'Homme, BMP15 se fixe sur BMPR-II et ALK6 pour transduire son signal via les Smad1/5/8 dans les cellules de la granulosa. L'hétérodimère GDF9/BMP15 induit la voie des Smad2/3. GDF9 seul n'a pas d'effet. Chez les rongeurs, GDF9 se fixe sur BMPR-II et ALK4 pour activer les Smad2/3. Tout comme chez l'Homme, l'hétérodimère GDF9/BMP15 active la voie des Smad2/3. Chez les rongeurs, c'est l'homodimère de BMP15 qui n'a pas d'effet sur les cellules de la granulosa (Peng, Li et al. 2013).

Chez l'Homme et la souris, les protéines Smad se divisent en trois catégories :

- les R-Smad : les récepteurs aux BMP et à l'AMH vont transduire leur signal par le biais des Smad 1, 5 ou 8. Les récepteurs aux TGF β et aux activines utilisent les Smad 2 et 3.
- La co-Smad, Smad4, est une Smad commune à toutes les voies de signalisation. Elle va former un complexe avec les R-Smad.
- Les I-Smad : Smad 6 et 7 vont réguler le signal en empêchant la liaison des R-Smad au récepteur de type I ou les interactions entre Smad.

a Les R-Smad

Les R-Smad sont constituées de deux régions globulaires, MH1 et MH2, reliées par une région appelée « linker ». La région N-terminale, plus connue sous le nom de domaine MH1 (Mad-homology 1) est très conservée chez toutes les R-Smad. Ce domaine permet la liaison à l'ADN qui se fait à l'aide d'une structure β -hairpin observée chez toutes les R-Smad (figure 16A). Le domaine MH2 joue des rôles importants dans la reconnaissance des récepteurs, dans la liaison aux facteurs de transcription et dans l'homomère et l'hétéro-oligomérisation des R-Smad et de la co-Smad. Le domaine MH2 des R-Smad présente un site Ser-X-Ser (figure 16A). Ce site est phosphorylé lorsque la Smad est recrutée au niveau du récepteur de type I, lui-même activé au préalable par phosphorylation. Le site Ser-X-Ser phosphorylé devient un site de liaison pour la co-Smad (Wu, Hu et al. 2001). Un ensemble d'acides aminés basiques sur le domaine MH2 permet aux R-Smad d'interagir avec la zone phosphorylée des récepteurs de type I. Une zone hydrophobe sur le domaine MH2 des R-Smad permet la liaison avec les protéines constitutives des pores nucléaires (nucléoporines). Cette même région hydrophobe va permettre aux R-Smad d'interagir, dans le noyau, avec des co-facteurs de liaison à l'ADN. La région « linker », entre les domaines MH1 et MH2, présente des sites pour l'ubiquitine ligase Smurf (Smad ubiquitination-related factor) ainsi que des sites de phosphorylation pour plusieurs classes de protéines kinases. Les R-Smad effectuent un transit permanent entre le cytoplasme et le noyau. Une fois phosphorylées, elles perdent leur affinité pour les facteurs qui les maintenaient dans le cytoplasme. Les R-Smad interagissent directement avec les nucléoporines de la membrane nucléaire grâce à leur région hydrophobe sur le domaine MH2 (Xu, Kang et al. 2002). L'export se fait de la même façon par liaison directe aux nucléoporines.

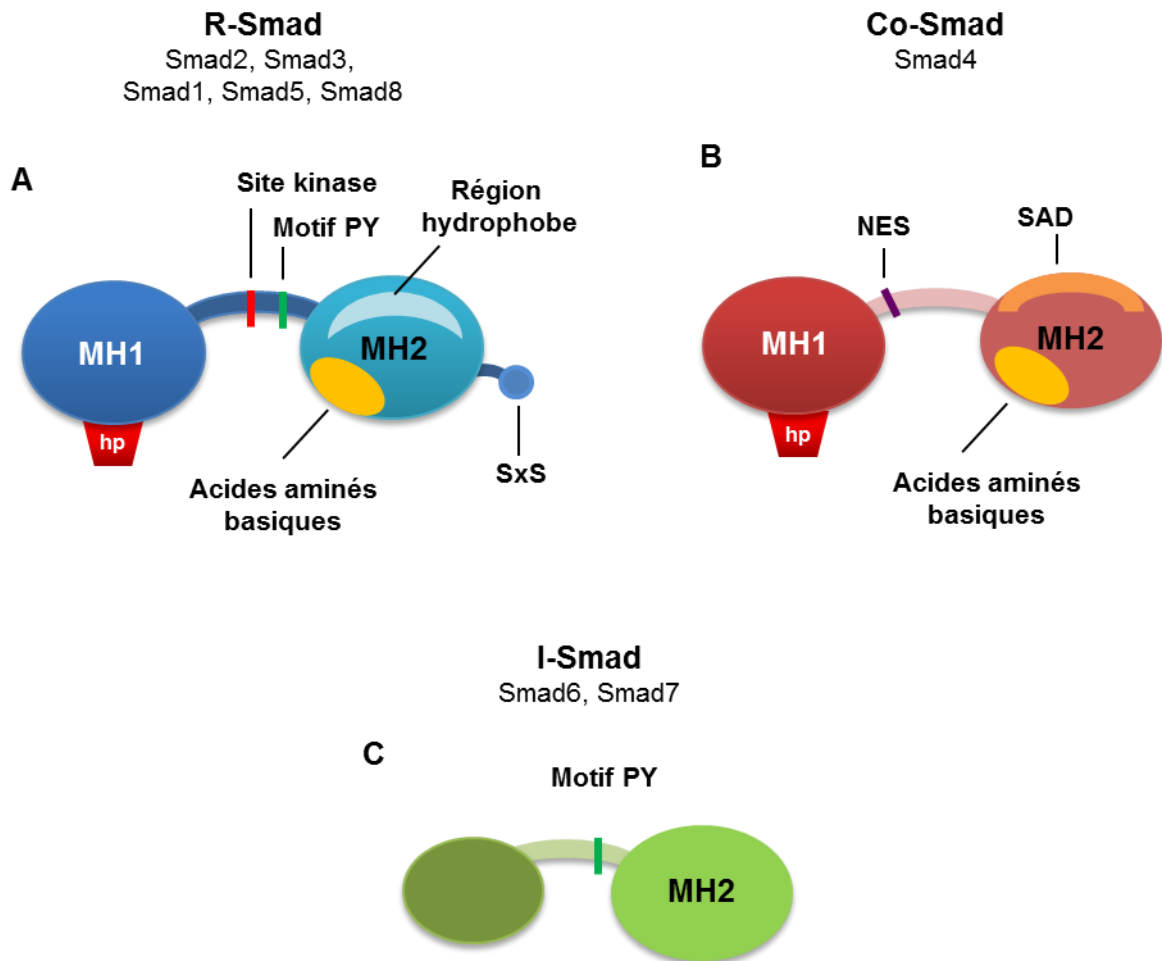


Figure 16 : Structure des différents types de protéines Smad. **A.** Les protéines R-Smad sont composées de deux domaines globulaires MH1 et MH2 reliés par une région « linker ». Le domaine MH1 permet la liaison à l'ADN par l'intermédiaire de la structure β-hairpin (hp). Le domaine MH2 présente un site Ser-X-Ser (SxS) qui sera phosphorylé suite au recrutement des R-Smad par le récepteur de type I. Ce site devient alors un site de liaison pour la co-Smad. Les acides aminés basiques permettent la liaison de la R-Smad avec la zone phosphorylée du récepteur de type I. La région hydrophobe permet aux R-Smads d'interagir avec les nucléoporines ce qui permet la translocation nucléaire de ces protéines. Cette même zone permet l'interaction avec des co-facteurs de liaison à l'ADN. La région linker présente des sites pour l'ubiquitine ligase Smurf ainsi que des sites de phosphorylation pour différentes protéines kinases. **B.** La co-Smad est structurellement proche des R-Smads. Les acides aminés basiques sur son domaine MH2 permet la liaison avec la queue phosphorylée des R-Smads. La zone SAD (Smad4 activation domain) permet la liaison à des co-facteurs dans le noyau. La co-Smad présente également un signal d'export nucléaire (NES) sur sa région linker. **C.** Les I-Smad ne présentent pas de domaine MH1 et ne peuvent donc pas se lier à l'ADN. Le domaine MH2 est très conservé entre les Smad et permet leurs interactions avec d'autres acteurs cellulaires (Massague, Seoane et al. 2005).

b ***La co-Smad***

La co-Smad, Smad4, possède tout comme les R-Smad deux domaines globulaires relié par une région « linker ». Le domaine MH1 présente une structure β -hairpin permettant à Smad4 de se fixer à l'ADN (figure 16B). Le domaine MH2 diffère de celui des R-Smad. En effet, il ne possède pas de site de phosphorylation. L'ensemble d'acides aminés basiques présents sur ce domaine permet la liaison de la co-Smad avec la queue phosphorylée des R-Smad. On peut également noter la présence, sur le domaine MH2, d'une zone appelée SAD (Smad4 activation domain) qui permet la liaison à des co-activateurs ou des co-répresseurs dans le noyau. La région « linker » de la protéine Smad4 présente un signal d'export nucléaire (NES). En effet, à la différence des R-Smad, la protéine Smad4 nécessite la liaison à des facteurs d'export nucléaire. La séquence NES est reconnue par le facteur CRM1 activant la sortie du noyau (Pierreux, Nicolas et al. 2000).

A l'heure actuelle, l'ensemble des complexes de Smad décrits contiennent la co-Smad et les expériences d'immunoprécipitation de chromatine réalisées montrent que la Smad4 est toujours associée avec les R-Smad. Cependant, différents types cellulaires déficients pour Smad4 sont toujours capable de répondre au TGF- β . Il a été observé que des cellules cancéreuses pancréatiques déficientes pour Smad4 présentent toujours un fort niveau de phosphorylation des R-Smad et une augmentation de la mobilité en réponse au TGF- β (Subramanian, Schwarz et al. 2004).

c ***Les I-Smad***

Smad6 et Smad7 sont constituées d'un domaine MH2 (conservé chez toutes les Smad) et d'une région N-terminale très différente du domaine MH1 des autres Smads (figure 16C). La Smad7 est un antagoniste de nombreux membres de la famille du TGF- β incluant le TGF- β lui-même, les activines et les BMPs alors que la Smad6 est un antagoniste spécifique des BMPs (Ishisaki, Yamato et al. 1999 ; Itoh, Landstrom et al. 1998). La région N-terminale des deux I-Smad présente 57% de divergence ce qui confère la spécificité des deux I-Smad. Ne possédant pas de motif Ser-X-Ser sur leur domaine MH2, les I-Smad ne sont pas phosphorylées après l'activation du récepteur de type I. Les I-Smad se fixent sur les récepteurs de type I activés après phosphorylation ce qui empêche la liaison et la

phosphorylation des R-Smad. Elles interfèrent également dans la formation des complexes de protéines Smad (Park 2005).

d Rôles de la protéine SARA

A l'état basal, les R-Smad sont essentiellement concentrées dans le cytoplasme. Ceci est dû à l'action de facteurs cytoplasmiques d'ancrage. Le mieux caractérisé est la protéine SARA (Smad anchor for receptor activation) qui permet la rétention des Smad2 et 3 (Tsukazaki, Chiang et al. 1998). Cette protéine contient un domaine spécifique de fixation des Smad, SBD (Smad binding domain) ainsi qu'un domaine FYVE qui lie les phospholipides membranaires. Le SBD de SARA va lier la zone hydrophobe présente sur le domaine MH2 des Smad2 et 3 et empêche leur translocation nucléaire. L'activation du récepteur de type I diminue l'affinité de la protéine SARA pour les Smad2 et 3. SARA a également un rôle de présentation des protéines Smad au récepteur de type I activé (Di Guglielmo, Le Roy et al. 2003). Une étude récente a cependant montré que SARA n'est pas indispensable à la transduction du signal du TGF- β . L'inhibition de l'expression de SARA dans des cellules HeLa n'interfère ni avec l'activation des Smad ou leur translocation nucléaire ni avec la régulation de gènes cibles du TGF- β (Bakkebo, Huse et al. 2012).

La protéine SARA ne lie pas Smad1 et, à l'heure actuelle, on ne connaît pas de facteurs participant à la rétention et à l'adressage au récepteur des protéines Smad1, 5 et 8.

e Smad binding element : SBE

La séquence de fixation sur l'ADN des protéines Smad a été originellement définie comme une séquence de 8 bases 5'-GTCTAGAC-3' (Zawel, Dai et al. 1998). Il a plus tard été montré que le Smad binding element (SBE) était la séquence 5'-GTCT-3' et sa séquence complémentaire 5'-AGAC-3'. La plupart des promoteurs régulés par les Smad contiennent plusieurs SBE. Les Smad reconnaissent le SBE grâce à leur structure β -hairpin sur le domaine MH1 (Shi, Wang et al. 1998). Certaines régions promotrices connues pour être régulées par le TGF- β ne présentent pas de SBE canonique mais des séquences proches. Il existe un certain degré de tolérance de la région du domaine MH1 qui se lie à l'ADN. Le second nucléotide de la séquence 5'-GTCT-3' n'interagit pas avec le domaine MH1 ce qui permet une substitution de base qui ne nuit pas à l'interaction des Smad (Shi, Wang et al. 1998). Les Smad peuvent également reconnaître des régions riches en GC sur certaines séquences promotrices (Kim,

Johnson et al. 1997).

f Partenaires transcriptionnels des protéines Smad

Les complexes R-Smad/Smad4 affinent la sélection et la régulation de leurs gènes cibles en s'associant avec d'autres facteurs de transcription. Certains facteurs sont spécifiques de la voie de signalisation du TGF- β et d'autres des BMPs. Ces associations confèrent la spécificité de la réponse. Les Smad peuvent activer ou réprimer l'expression de leurs gènes cibles. Pour cela, elles vont se lier à des facteurs co-activateurs ou co-répresseurs. Parmi les premiers co-activateurs découverts, on peut citer p300 et CBP qui interagissent avec les Smad1, 2, 3 et 4 sur leur domaine MH2 (Pouponnot, Jayaraman et al. 1998). La surexpression de ces facteurs permet d'accroître la réponse des protéines Smad. A l'inverse, certains facteurs répriment l'expression des gènes cibles des Smad. On peut prendre l'exemple de l'inhibition de l'expression du gène *Id1* par le TGF- β . Le TGF- β va induire l'expression du facteur ATF3 dans un premier temps, puis ce facteur se fixe sur la Smad3 permettant la régulation négative d'*Id1* (Kang, Chen et al. 2003).

g Régulation du signal

Suite à une accumulation en réponse d'un signal extracellulaire, les Smads sont tout d'abord déphosphorylées par des phosphatases (Bruce and Sapkota 2012). Elles regagnent ensuite le cytoplasme ou elles peuvent être ubiquitinylées et dégradées. Smad1 et 2 ont été les premières Smads dont l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome ont été décrites (Zhu, Kavsak et al. 1999). Ce sont les ubiquitine ligase de la famille Smurf qui interviennent dans ce processus. Les protéines Smurf interagissent avec le motif PY de la région linker (Izzi and Attisano 2004). La co-Smad, Smad4, ne contient pas de motif PY et ne peuvent pas être directement ubiquitinylées par Smurf. Smad4 pourrait cependant être ubiquitinylée quand elle est liée aux R-Smad. Les protéines Smurf peuvent également réguler le signal par l'ubiquitination des récepteurs, des co-récepteurs et des I-Smad.

La région linker des protéines Smad contient de nombreux sites de phosphorylations pour différentes kinases telles que la MAPK ou encore les CDK. Les phosphorylations induites par ces kinases permettent également de réguler le signal (Bruce and Sapkota 2012).

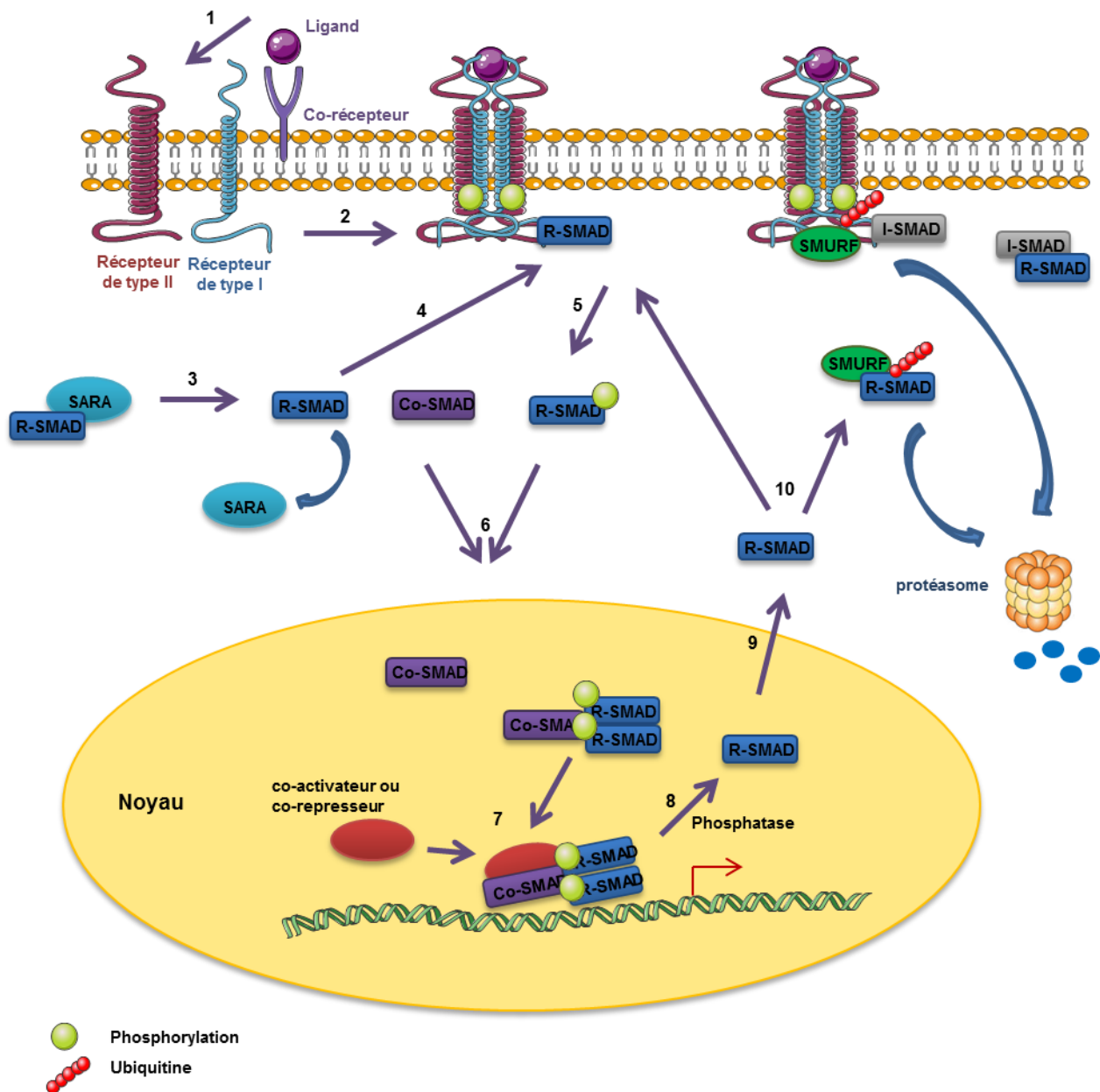


Figure 17 : Voie de signalisation canonique des membres de la famille du TGF- β . (1) Le ligand, présenté ou non par un co-récepteur, va induire la formation d'un complexe entre les récepteurs de type I et de type II. (2) Le récepteur de type II va phosphoryler le récepteur de type I sur une région GS intracellulaire. (3) Les protéines R-Smad retenues dans le cytoplasme par la protéine SARA vont être relâchées et (4) phosphorylées au niveau de la queue C-terminale du récepteur de type I. (5) Une fois phosphorylées, les R-Smads se lient à la co-Smad et (6) pénètrent dans le noyau. (7) En association avec d'autres facteurs de transcriptions le complexe de protéines Smad va réguler les gènes cibles du ligand. (8) Après déphosphorylation, les Smad retournent dans le cytoplasme (9). (10) Les Smads vont alors être prise en charge par les protéines Smurfs qui vont induire leur ubiquitination et leur dégradation au protéasome (Massague, Seoane et al. 2005).

1.4 Voie de signalisation : Résumé

Un complexe se forme entre les récepteurs de type I et de type II après la fixation du ligand. Cette étape peut nécessiter l'action d'un corécepteur (figure 17). La région GS du récepteur de type I, préalablement masquée par des facteurs intracellulaires, devient accessible et va être phosphorylée grâce à l'activité kinase constitutive du récepteur de type II. Cette phosphorylation va rendre la région GS affine pour les protéines Smad à leur tour phosphorylées sur leur domaine Ser-X-Ser par l'activité kinase induite du récepteur de type I. Cette phosphorylation empêche l'interaction entre les parties MH1 et MH2 des R-Smad qui normalement s'inhibent réciproquement. Les Smad forment souvent des hétérotrimères composés de deux R-Smad (identiques ou non) et de la co-Smad (Chacko, Qin et al. 2001). La formation de ce complexe se fait grâce à l'interaction des domaines MH2 des différentes protéines Smad et peut avoir lieu dans le cytoplasme ou dans le noyau. Une fois dans le noyau, le complexe de protéines Smad va s'associer avec des co-facteurs pour permettre la régulation spécifiques des gènes cibles des différents membres de la famille du TGF- β . La déphosphorylation des Smad permet l'arrêt du signal et la sortie du noyau. L'ubiquitination par les protéines Smurf peut alors entraîner la dégradation des Smad par le protéasome. Les I-Smad interviennent dans la régulation négative du signal en interférant avec la formation du complexe ou encore en inhibant la fixation des R-Smad sur le récepteur de type I (Massague, Seoane et al. 2005).

Les Smad interagissent avec d'autres voies de signalisation pour répondre à des signaux extracellulaires variés. Ces interactions sont résumées dans la figure 18.

2 Rôles des membres de la famille du TGF- β dans la fonction reproductrice

La génération de lignées de souris KO pour les membres de cette famille ainsi que les acteurs de leur voie de signalisation a permis de comprendre certains de leurs rôles. L'ensemble de ces lignées est répertorié dans les tableaux 5 et 6.

2.1 Rôles des ligands de la famille du TGF- β sur les CGP

La famille du TGF- β est une des familles connues pour réguler le développement et la fonction ovarienne. La première étape du développement ovarien est la mise en place du lignage germinale c'est-à-dire des cellules germinales primordiales (CGP).

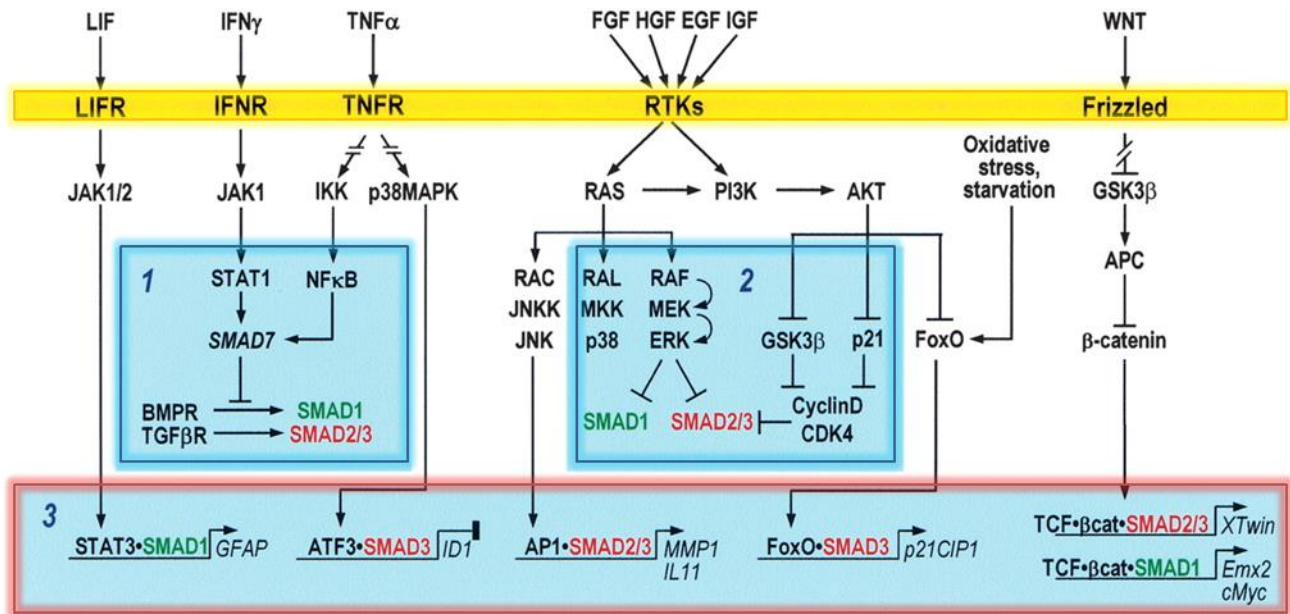


Figure 18 : Les Smad au cœur d'autres voies de signalisation. Les protéines Smad interagissent avec d'autres voies de signalisation majeures. (1) Les voies JAK/STAT et NFκB vont induire l'expression de Smad7 inhibant de ce fait l'activation des R-Smad. (2) La voie de signalisation RAS active des protéines kinases (ERK, CDK...) qui vont inhiber le signal des Smad par phosphorylation de leur région linker essentiellement. (3) De nombreuses voies de signalisation vont induire l'expression de facteurs de transcription qui vont former des complexes avec des protéines Smad. C'est le cas des facteurs STAT3, ATF3, FOXO, TCF et des facteurs de la famille AP1 (Massague, Seoane et al. 2005).

De nombreux membres de la famille du TGF- β interviennent dans la mise en place de ce lignage. Les BMPs représentent environ la moitié des membres de cette famille. BMP4 et BMP8b sont produits par l'ectoderme extra-embryonnaire et BMP2 est produit dans l'endoderme. L'association de ces facteurs va permettre à certaines cellules de l'épiblaste de se spécifier pour devenir des CGP (Ying and Zhao 2001). L'importance de ces facteurs a été déterminée en analysant les modèles de souris mutantes. Les souris KO pour *Bmp2* ou *Bmp8b* présentent un nombre très diminué de CGP (Ying, Liu et al. 2000). Certaines souris KO *Bmp8b* peuvent même en être complètement dépourvues (Tableau 5). Une autre BMP est importante pour la mise en place de la lignée germinale : BMP4. En effet, les souris KO *Bmp4* n'arrivent pas à générer de CGP (Lawson, Dunn et al. 1999).

Des études *in vitro* ont également montré que BMP4 pouvait induire la formation de CGP à partir d'épiblaste ou de cellules souches en culture (Pesce, Klinger et al. 2002) (Okamura, Hayashi et al. 2005 ; Shirazi, Zarnani et al. 2012).

Enfin, bien que les souris mutantes pour l'activine et le TGF- β présentent un développement normal des CGP, il a été montré, *in vitro*, que ces deux facteurs inhibaient la prolifération de CGP de souris en culture (Godin and Wylie 1991 ; Richards, Enders et al. 1999).

Suite à leur migration dans la crête génitale femelle, à 10-11 jpc chez la souris, les CGP vont devenir ovogonies et se multiplier de façon intensive. Les ovogonies vont ensuite débiter la méiose à 13-14 jpc et se bloquer en prophase I, on parle alors d'ovocyte I. Cet ovocyte I va s'entourer d'une couche allongée de cellules de la granulosa pour former les follicules primordiaux dans les trois premiers jours qui suivent la naissance de l'animal. L'implication, si elle existe, des membres de la famille du TGF- β dans le passage du stade CGP au stade follicule primordial est toujours inconnu.

2.2 Voie de signalisation du TGF- β : rôles sur les CGP

a Récepteur de type I

L'invalidation des gènes codant pour certains acteurs de la voie de signalisation des membres du TGF- β peut également être délétère pour la spécification, la prolifération et la survie des CGP (Saitou and Yamaji 2012).

Ligands	Lignées KO (-/-)	Phénotype général	Fonction reproductrice femelle	Références
TGF-β1	Mort embryonnaire	Pas de données	Pas de données	(Memon, Anway et al. 2008)
TGF-β2	Mort périnatale	Pas de données	Augmentation des CGP, activation du pool de follicules primordiaux	(Memon, Anway et al. 2008)
TGF-β3	Mort périnatale	Pas de données	Pas de données	(Memon, Anway et al. 2008)
BMP2	Mort embryonnaire	Malformation de l'amnion/chorion	Peu de CGP	(Zhang and Bradley 1996)
BMP3	Viable	Augmentation de la densité osseuse	Pas de défaut, fertile	(Daluiski, Engstrand et al. 2001)
BMP3b GDF10	Viable	Mauvaise régulation de la différenciation ostéoblastique	Pas de défaut, fertile	(Zhao, Lawler et al. 1999)
BMP4 BMP2b	Mort embryonnaire	Pas de formation du mésoderme	Pas de CGP	(Lawson, Dunn et al. 1999), (Winnier, Blessing et al. 1995), (Dunn, Winnier et al. 1997)
BMP5	Mort embryonnaire	Pas de formation du mésoderme	Pas de données	(Pfendler, Yoon et al. 2000)
BMP6	Viable	Dysfonctionnement des ostéoblastes	Peu d'ovocytes ovulés, hypofertile	(Sugiura, Su et al. 2010)
BMP7/OP1	Mort périnatale	Défauts au niveau des yeux, des reins et des os	Pas de données	(Jena, Martin-Seisdedos et al. 1997)
BMP8a	Viable	Développement normal	Fertile	(Zhao, Liaw et al. 1998)
BMP8b	Létal (selon fond génétique)	Problème de développement embryonnaire (allantoïde)	Pas ou peu de CGP	(Ying, Liu et al. 2000)
BMP9 GDF2	Viable	Malformation artério-veineuse et squelettique, problème de vascularisation de la rétine	Pas de données	(Ricard, Ciais et al. 2012)
BMP10	Mort embryonnaire	Dysgénésie cardiaque	Pas de données	(Chen, Shi et al. 2004)
BMP11 GDF11	Mort néonatale	Anomalies : squelette, rein, estomac, rétine, rate, pancréas...	Pas de données	(McPherron, Lawler et al. 1999)
BMP12 GDF7	Mort prématurée (selon fond génétique)	Hydrocéphalie, anomalies cérébrales diverses	Pas de données	(Lee, Mendelsohn et al. 1998)
BMP13/GDF6	Viable	Nombreux défauts du squelette et du crâne	Pas de données	(Clendenning and Mortlock 2012)
BMP15/GDF9b	Viable	Défaut de la fonction reproductrice	Peu d'ovocytes ovulés, dysfonction du cumulus, hypofertile	(Yan, Wang et al. 2001)
BMP16/Nodal	Mort embryonnaire	Défaut de formation du mésoderme	Pas de données	(Lowe, Yamada et al. 2001)
GDF1	Mort périnatale	Situs inversus, multiples défauts cardiaques, cerveau, pancréas, rate...	Pas de données	(Bengtsson, Epifantseva et al. 2008)
GDF3	Viable	Protection contre l'obésité induite par un régime riche en lipides	Fertilité normale	(Shen, Huang et al. 2009)
GDF5/CDMP1	Pas de lignée KO	X	X	x
GDF8 myostatine	Viable	Hyperplasie et hypertrophie des muscles striés	Pas de données	(McPherron, Lawler et al. 1997)
GDF9	Viable	Infertilité femelle	Folliculogenèse bloquée au stade primaire, infertile	(Dong, Albertini et al. 1996)
GDF15/MIC-1	Viable	Augmentation des adipocytes et prise de poids	Pas de données	(Tsai, Macia et al. 2013)
GDNF	Viable	Agénésie ou dysgénésie rénale	Pas de données	(Pichel, Shen et al. 1996)
Inhibin α	Viable	Infertilité femelle	Tumeur de la granulosa	(Matzuk, Finegold et al. 1992)
Inhibine Activine βA	Mort néonatale	Absence de vibrisse et défauts des incisives basses et du palais	Pas de données	(Matzuk, Kumar et al. 1995)
Inhibine Activine βB	Viable	Pas de paupières	Problème de lactation, fertile	(Vassalli, Matzuk et al. 1994)
Inhibine Activine βC	Viable	Pas d'anomalies apparentes	Pas d'anomalies apparentes, fertile	(Lau, Kumar et al. 2000)
Inhibine Activine βE	Viable	Pas d'anomalies apparentes	Pas d'anomalies apparentes, fertile	(Lau, Kumar et al. 2000)
Lefty1	Mort périnatale	Multiples défauts de positionnement gauche-droite des viscères	Pas de données	(Meno, Shimono et al. 1998)
Lefty2	Mort embryonnaire	Défaut de mise en place des axes	Pas de données	(Meno, Gritsman et al. 1999)
Neurturine	Viable	Anomalies du système parasymphatique	Fertilité normale	(Heuckeroth, Enomoto et al. 1999)
Persephine	Viable	Sensible à l'ischémie cérébrale	Fertilité normale	(Tomac, Agulnick et al. 2002)
Artemine	Viable	Anomalies du système parasymphatique	Pas de données	(Honma, Araki et al. 2002)
AMH/MIS	Viable	Hypofertilité femelle	Folliculogenèse accélérée, fertile	(Durlinger, Kramer et al. 1999) (Durlinger, Gruijters et al. 2001)

Tableau 5 : Les différentes lignées KO des ligands de la famille du TGF-β: Rôles dans la fonction reproductive femelle

Les souris KO pour *Acvr1*, qui code pour le récepteur de type I des BMPs ActR-IA (ALK2), meurent précocement pendant la vie embryonnaire du fait d'anomalies de mise en place de l'endoderme vicéral (Gu, Reynolds et al. 1999 ; Mishina, Crombie et al. 1999) (tableau 6). Les embryons *Acvr1* KO présentent un déficit de CGP et les souris hétérozygotes en ont un nombre réduit (de Sousa Lopes, Roelen et al. 2004). Le phénotype de ces souris étant similaire à celui des souris *Bmp4* KO, les auteurs ont déduit que BMP4 transduisait son signal via le récepteur de type I ActR-IA dans l'endoderme pour induire la formation des CGP. De plus, l'expression d'une forme constitutivement active du récepteur ActR-IA chez les souris KO pour *Bmp4* permet le « sauvetage phénotypique » de ces souris (de Sousa Lopes, Roelen et al. 2004).

b Les protéines Smad

La génération de souris KO pour les différents gènes *Smad* a permis de mettre en évidence le rôle de ces protéines sur le développement de CGP (tableau 6).

Les souris KO pour *Smad1* meurent pendant la vie embryonnaire entre 10.5 et 11.5 jpc. Ces souris ne présentent que peu de CGP (Tremblay, Dunn et al. 2001). *Smad1* étant exprimé tôt pendant l'embryogenèse et son expression cessant après 7.5 jpc, cette protéine aurait plutôt un rôle dans la spécification de CGP. De plus, la différenciation des CGP à partir de l'épiblaste en culture requiert une activation de *Smad1* par BMP4 (Hayashi, Kobayashi et al. 2002). Les souris KO pour le gène *Smad5* présentent un phénotype similaire. Elles meurent pendant la vie embryonnaire entre 9.5 et 11.5 jpc (Chang, Huylebroeck et al. 1999) et les embryons KO ne possèdent que très peu de CGP. Chez certaines souris KO *Smad5*, les CGP présentes peuvent être mal localisées suggérant un rôle de *Smad5* dans l'adressage des CGP à la crête génitale (Chang and Matzuk 2001). Les souris KO pour le gène *Smad4* meurent précocement d'un défaut de gastrulation entre 6.5 et 8.5 jpc (Sirard, de la Pompa et al. 1998) (Yang, Li et al. 1998). Comme pour les souris précédemment décrites dans ce paragraphe elles sont dépourvues de CGP.

L'ensemble de ces études montre l'importance de la signalisation des membres de la famille du TGF- β pour le développement, la prolifération et le maintien de CGP dans la mise en place d'une fonction reproductrice normale.

Récepteurs de type II	Lignées KO (-/-)	Phénotype général	Fonction reproductrice femelle	Références
TβR-II	Mort embryonnaire	pas de formation du sac vitellin	Pas de données	(Oshima, Oshima et al. 1996)
ActR-IIA	Mort périnatale(25%)	Infertilité femelle	Suppression de la FSH	(Matzuk, Kumar et al. 1995)
ActR-IIB	Mort périnatale	Asymétrie latérale : problème cardiaque	Pas de données	(Oh and Li 1997)
BMPR-II	Mort embryonnaire	Pas de formation du mésoderme	Pas de données	(Beppu, Kawabata et al. 2000)
AMHR-II	Viable	Hypofertilité femelle	Folliculogenèse accélérée, fertile	(Mishina, Rey et al. 1996)
Récepteurs de type I	Lignées KO (-/-)	Phénotype général	Fonction reproductrice femelle	Références
ActR-I1 (ALK1)	Mort embryonnaire	Problème vasculaire : fusion des veines et des artères	Pas de données	(Urness, Sorensen et al. 2000)
ActR-IA (ALK2)	Mort embryonnaire	Pas de formation du mésoderme	Pas de CGP	(Gu, Reynolds et al. 1999; de Sousa Lopes, Roelen et al. 2004) (Mishina, Crombie et al. 1999)
BMPR-IA (ALK3)	Mort embryonnaire	Pas de formation du mésoderme	Pas de données	(Mishina, Suzuki et al. 1995)
ActR-IB (ALK4)	Mort embryonnaire	Désorganisation de l'épiblaste et de l'ectoderme extra-embryonnaire	Pas de données	(Gu, Nomura et al. 1998)
TβR-I (ALK5)	Mort embryonnaire	Pas de formation du sac vitellin ni du placenta	Pas de données	(Larsson, Goumans et al. 2001)
BMPR-IB (ALK6)	Viable	Brachydactilie, défaut de la rétine	Problème d'expansion du cumulus, cycles oestriens irréguliers, fertile	(Yi, Daluiski et al. 2000) (Yi, LaPolta et al. 2001)
ActR-IC (ALK7)	Viable	Pas d'anomalies détectées	Pas de données	(Jornvall, Reissmann et al. 2004)
Smad	Lignées KO (-/-)	Phénotype général	Fonction reproductrice femelle	Références
Smad1	Mort embryonnaire	Problème de connexion au placenta	Peu de CGP	(Tremblay, Dunn et al. 2001)
Smad2	Mort embryonnaire	Pas de gastrulation et de formation du mésoderme	Pas de données	(Nomura and Li 1998) (Waldrip, Bikoff et al. 1998)
Smad3	Viable	Défaut de réponse immunitaire	Hypofertile : problème de développement folliculaire	(Tomic, Brodie et al. 2002)
Smad4	Mort embryonnaire	Endoderme viscéraldéfectueux	Pas de CGP	(Sirard, de la Pompa et al. 1998) (Yang, Li et al. 1998)
Smad5	Mort embryonnaire	Défauts au niveau du cerveau, du cœur et des intestins	peu de CGP	(Chang and Matzuk 2001) (Chang, Huylebroeck et al. 1999)
Smad6	Mort post-natale (majorité)	Problèmes cardiaques	Pas de données	(Galvin, Donovan et al. 2000)
Smad7	Mort embryonnaire (partielle)	Défaut de réponse immunitaire et de développement du cœur	Portées plus petites	(Li, Rosendahl et al. 2006) (Chen, Chen et al. 2009)
Smad8 (Smad9)	Viable	Défaut de remodelage vasculaire	Pas de défaut, fertile	(Pangas, Li et al. 2008) (Arnold, Maretto et al. 2006)

Tableau 6 : Les différentes lignées KO des acteurs de la voie de signalisation de la famille du TGF-β: rôles dans la fonction reproductive femelle

2.3 Autres rôles au cours du développement

Des membres de la famille du TGF- β ou les acteurs de leurs voies de signalisation sont impliqués dans le développement embryonnaire précoce, plus particulièrement dans le déroulement de la gastrulation. Les embryons *Bmpr2* et *Bmpr1a* KO présentent un défaut de formation du mésoderme (Beppu, Kawabata et al. 2000 ; Mishina, Suzuki et al. 1995). En effet, les souris KO pour ces récepteurs meurent avant la gastrulation. Les souris double KO *Acvr2a/Acvr2b*, codant pour les récepteurs de type II de l'activine, présentent le même phénotype (Song, Oh et al. 1999). Cependant, les KO simples des gènes codant pour les récepteurs ActR-IIA (*Acvr2a*) et ActR-IIB (*Acvr2b*) se développent normalement suggérant une redondance de ces deux récepteurs pour la mise en place du mésoderme (Matzuk, Kumar et al. 1995 ; Oh and Li 1997).

Le récepteur ActR-IA est lui aussi essentiel au développement embryonnaire, comme il l'a été décrit précédemment (Mishina, Crombie et al. 1999) (page 83).

Nodal, encore connu sous le nom de BMP16, est essentiel pour la formation de l'endoderme et du mésoderme au moment de la gastrulation. Les souris mutantes pour *Nodal* meurent pendant la gastrulation (Conlon, Lyons et al. 1994).

Les souris KO pour le gène *Smad2* présentent un phénotype proche des souris KO pour *Nodal*. En effet, elles meurent au moment de la gastrulation entre 7.5 et 8.5 jpc (Nomura and Li 1998).

2.4 Sur la folliculogénèse

a Formation et développement des follicules

GDF9 (Growth and differentiation factor-9) est un facteur produit par les follicules primaires qui pourrait avoir un rôle dans le recrutement des follicules primordiaux. En effet, des ovaires de rats immatures traités 10 jours au GDF9 présentent une diminution de la réserve de follicules primordiaux et un accroissement des follicules primaires et préantraux en comparaison à des ovaires non traités (Enqvist, Ignatius et al. 1992). De plus, la folliculogénèse chez les souris KO pour le *Gdf9* est arrêtée au stade follicule primaire (Dong, Albertini et al. 1996).

L'ovocyte présent dans les follicules primaires de ces souris, quand il ne dégénère pas, présente une compétence méiotique limitée et une mauvaise répartition des organelles. Ceci indique que GDF9 est essentiel au maintien et à la différenciation du follicule primaire vers des stades plus avancés. BMP15, aussi appelé GDF9b du fait de sa forte homologie avec GDF9, joue un rôle dans la fonction reproductrice femelle. Les souris KO pour ce facteur ne présentent qu'une atteinte minime de leur fonction reproductrice. Le nombre de petits par portée est légèrement diminué en raison de problèmes d'ovulation (Yan, Wang et al. 2001). En revanche, les brebis invalidées pour ce gène sont stériles avec une folliculogenèse arrêtée au stade primaire (Galloway, McNatty et al. 2000).

BMP4 et BMP7 sont également impliqués dans la transition follicule primordial-follicule primaire. En 2001, une étude a montré qu'une injection de BMP7 dans la bourse ovarienne de rat de 28 jours stimulait la conversion des follicules primordiaux en follicules primaires (Lee, Otsuka et al. 2001).

Des ovaires de rat de 4 jours, (essentiellement composés de follicules primordiaux et de quelques follicules primaires) cultivés en présence de BMP4, présentent un accroissement du nombre de petits follicules en croissance et une diminution du nombre de follicules primordiaux (Nilsson and Skinner 2003).

Les souris KO pour les différentes isoformes du *Tgfb* ou KO pour le *Tgfb2* meurent prématurément pendant l'embryogenèse ou en période périnatale ce qui empêche de déterminer le rôle précis de ces facteurs sur la folliculogenèse. Cependant, il a été montré in vitro que le TGF- β stimulait la croissance des follicules préantraux chez la souris (Liu, Andoh et al. 1999).

L'hormone anti-Müllerienne est également un membre de la famille du TGF- β impliqué dans la régulation de la folliculogenèse. Les rôles de cette hormone seront développés ultérieurement (page 107).

b Le système inhibine-activine

Les inhibines et activines sont des glycoprotéines dimériques qui sont définies par leur action principale sur les cellules gonadotropes hypophysaires. Les activines stimulent la sécrétion de FSH et les inhibines la répriment. Elles appartiennent à la famille du TGF- β du fait de leur homologie structurale avec les membres de cette famille.

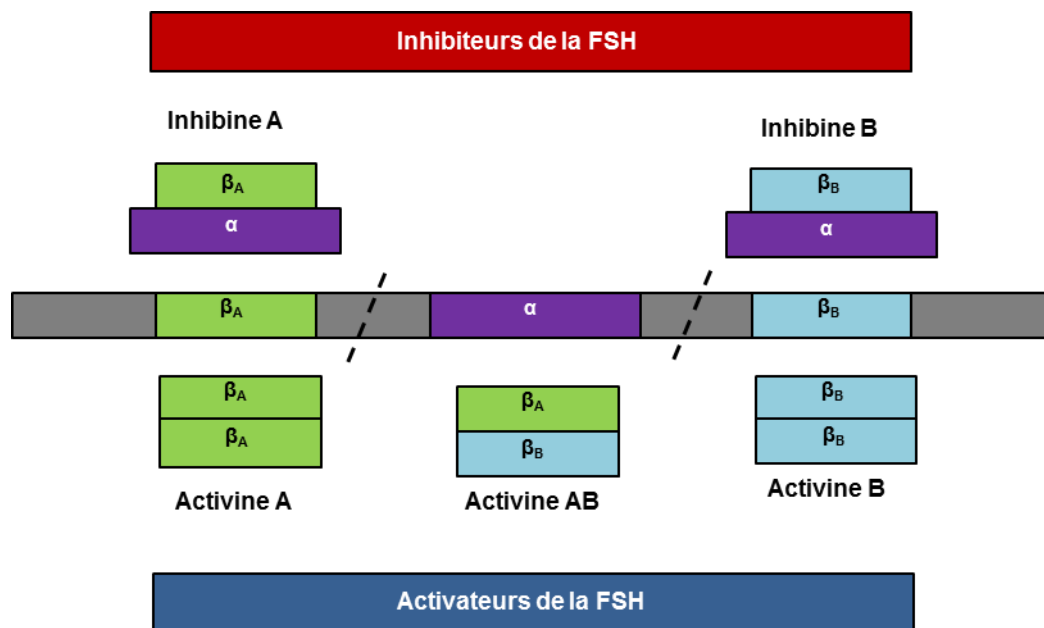


Figure 19 : Structures des inhibines et activines. L'inhibine A est composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β_A . L'inhibine B est composée de la même sous-unité α et d'une sous-unité β_B . Les activines sont constituées des mêmes sous-unités β_A et β_B que les inhibines. Les différentes associations de ces deux sous-unités β vont permettre la formation de l'activine A (deux sous-unités β_A), de l'activine B (deux sous-unités β_B) et de l'activine AB (une sous-unité β_A et une sous-unité β_B) (Knight and Glistler 2001).

Les inhibines A et B sont des hétérodimères peptidiques constituées de 2 sous-unités liées par des ponts-disulfures : une sous-unité α et une sous-unité β (Knight and Glister 2001). La sous-unité α est commune aux deux inhibines alors qu'il existe deux types de sous-unité β . L'inhibine A est constituée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β_A et l'inhibine B est constituée de la même sous-unité α et d'une sous-unité β_B . Les activines sont des homodimères de sous-unités β . L'activine A est formée de deux sous-unités β_A , l'activine B de deux sous-unités β_B et l'activine AB d'une sous-unité β_A et d'une sous-unité β_B (figure 19).

L'activine se lie à un récepteur serine/thréonine kinase de type II (ActR-IIIB) qui se lie et phosphoryle un récepteur de type I (ALK4). L'activation des récepteurs enclenche la cascade de phosphorylation des Smad2/3 intracellulaires. Les Smad subissent une translocation nucléaire et agissent au niveau de gènes cibles. En ce qui concerne l'inhibine, on ne connaît toujours pas son récepteur spécifique.

L'hypothèse admise est que l'inhibine se fixe au récepteur de type II de l'activine empêchant celle-ci de se lier et de former un complexe actif avec le récepteur de type I (Lebrun and Vale 1997). Les inhibines sont capables de se lier au récepteur de type II uniquement lorsqu'une autre molécule membranaire est présente, le betaglycan (Knight, Satchell et al. 2012).

Les cellules de la granulosa sont les principales cellules productrices d'inhibine et d'activine dans l'ovaire. Les cellules germinales et somatiques (granulosa, thèque et cellules lutéales) expriment les récepteurs nécessaires à la transduction du signal de ces protéines. Au cours de la folliculogenèse, l'expression des différentes sous-unités de l'inhibine et de l'activine varie (figure 20) expliquant leurs différents rôles sur la fonction ovarienne (Knight, Satchell et al. 2012).

L'inhibine et l'activine ont une action paracrine ovarienne et une action endocrine au niveau de l'antéhypophyse où elles vont agir sur les cellules gonadotropes. Au cours du cycle menstruel, l'inhibine B est produite pendant la phase folliculaire et l'inhibine A prend le relais en phase lutéale. L'action frénatrice de l'inhibine B sur la sécrétion de FSH est connue (McLachlan, Robertson et al. 1987). Au milieu de la phase folliculaire les taux d'inhibine B atteignent un point culminant et les taux de FSH commencent à baisser. Le rôle frénateur de l'inhibine A est moins bien démontré dans les situations physiologiques.

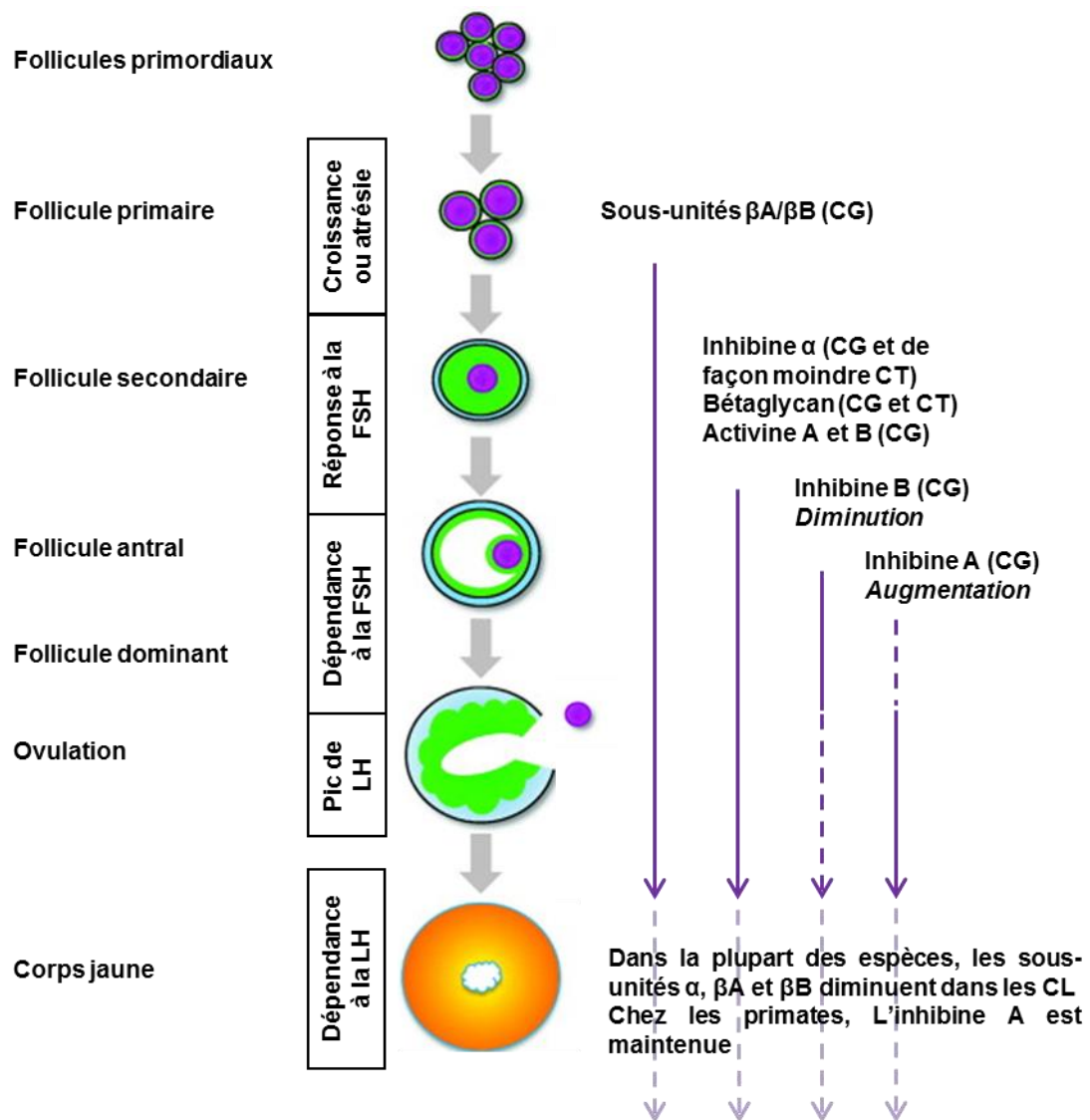


Figure 20 : Expression des inhibines et activines au cours de la folliculogénèse. Les différentes sous-unités des inhibines et activines sont exprimées différemment en fonction du stade folliculaire. Les types cellulaires sont indiqués entre parenthèses CG: cellules de la granulosa, CT: cellules de la thèque, CL: cellules lutéales. Les flèches pleines indiquent une expression constante et les flèches en pointillés représentent une diminution d'expression (Knight, Satchell et al. 2012).

Le rôle des activines a été plus amplement décrit. Son rôle le plus connu est celui sur l'augmentation de la production de FSH. Dans le follicule préantral et antral, l'activine stimule la croissance des CG et l'expression du récepteur à la FSH. L'activine aide également à la maturation et au développement de l'ovocyte. C'est une régulation fine des niveaux d'inhibine et d'activine dans l'ovaire qui va permettre un bon développement folliculaire pouvant aboutir à l'ovulation d'un ovocyte compétent.

2.5 Sur la fonction utérine

Chez les rongeurs et les primates, le processus d'implantation se déroule essentiellement en deux étapes. L'embryon va dans un premier temps adhérer à l'épithélium utérin. Suite à son attachement, l'embryon va pénétrer dans le stroma endométrial. Le succès de l'implantation chez ces espèces requiert un rapide remodelage des cellules stromales. Ce processus porte le nom de décidualisation (Cha, Sun et al. 2012). La décidualisation est caractérisée par des changements morphologiques et fonctionnels du stroma utérin. Les cellules stromales se multiplient et se différencient en cellules déciduales. Ce processus est une étape critique dans la mise en place de l'interface foeto-maternelle pendant l'implantation. Les membres de la famille du TGF- β jouent un rôle important dans les processus d'implantation et de décidualisation utérine chez la souris.

L'expression de BMP2 (Ying and Zhao 2000), BMP4 (Ying and Zhao 2000), BMP7 (Ozkaynak, Jin et al. 1997 ; Paria, Ma et al. 2001) et GDF10 (Zhao, Lawler et al. 1999) a été décrite dans l'utérus de souris. L'expression de BMP7, très forte dans l'utérus non gravide, est perdue à 4 jpc (Ozkaynak, Jin et al. 1997). Son rôle a été étudié chez l'homme où BMP7 est également exprimé dans l'utérus non gravide. Son expression est significativement diminuée en phase sécrétoire et dans les cellules déciduales après l'implantation (Kodama, Yoshino et al. 2010). Des cellules stromales de l'endomètre en culture, stimulées à la progestérone, présentent une diminution de l'expression de BMP7 corrélée à une augmentation d'IGFBP1 qui est un marqueur de la décidualisation. Ces cellules mises en culture avec différentes concentrations de BMP7 voient l'expression d'IGFBP1 diminuée de façon dose-dépendante. Ces résultats montrent que la diminution de l'expression de BMP7 semble essentielle à la mise en place d'une décidualisation normale. Une autre étude a montré que TGF- β 1 est exprimé dans l'endomètre humain et induit une augmentation de PRL, un autre marqueur de la décidualisation, par des cellules stromales en culture (Stoikos, Harrison et al. 2008).

Parmi les BMP exprimés dans l'utérus seule l'expression de BMP2 est corrélée de façon spatio-temporelle avec l'implantation. BMP2 est exprimé dans la zone déciduale au niveau des sites d'implantation. Les souris KO *Bmp2* meurent pendant l'embryogenèse (Zhang and Bradley 1996). Des souris KO conditionnelles pour *Bmp2* ont donc été générées où le gène *Bmp2* est spécifiquement invalidé dans l'utérus (Lee, Jeong et al. 2007). Ces souris sont infertiles du fait de l'absence de sites d'implantations et de réponse déciduale. De plus, l'ajout de BMP2 sur un modèle de décidualisation ex vivo à savoir, des cultures de cellules stromales de l'endomètre, induit une augmentation de l'expression de PRL (prolactine), un marqueur de la décidualisation. Cette étude a montré que BMP2 est un régulateur essentiel du processus de décidualisation utérine. La perte de l'expression de BMP2 ne peut pas être compensée par les autres membres de la famille des BMPs.

L'activine A joue également un rôle important dans le processus de décidualisation. Il a été montré qu'elle accélère la décidualisation et que les cellules déciduales sécrètent de grandes concentrations de ce facteur (Jones, Salamonsen et al. 2002). Une étape critique de la décidualisation est le remodelage de l'environnement. Ce remodelage est en partie dû à l'activité de metalloprotéinases (MMP). L'activine A stimule la production des précurseurs des MMP, proMMP-2, -3, -7 et -9, dans les cellules endométriales au moment de la décidualisation (Jones, Findlay et al. 2006). L'inhibine A antagonise cet effet.

Les souris KO pour *Nodal* meurent pendant la vie embryonnaire empêchant l'étude des rôles potentiels de ce dernier sur la fonction reproductrice femelle. La génération de souris KO conditionnelles où le facteur *Nodal* est spécifiquement invalidé dans l'utérus a permis de mettre en évidence un rôle de ce facteur dans le développement du placenta et dans le maintien de la gestation (Park, DeMayo et al. 2012). Les souris cKO pour *Nodal* présentent de sévères défauts dans la décidua maternelle au moment de la formation du placenta. De plus, les petits naissent prématurément à 17,5 jpc ou meurent in utéro.

V L'hormone anti-Müllérienne

1 Historique

Nous devons la découverte de l'hormone anti-Müllérienne aux travaux pionniers du scientifique français Alfred Jost en 1953. L'AMH portait alors le nom «d'inhibiteur müllérien» (Jost 1953). En 1969, Régine Picon, une élève de Jost, a mis au point un test de

détection d'activité de l'AMH (Picon 1969). En 1974, Marie-Geneviève Blanchard et Nathalie Josso mirent en évidence pour la première fois la production sertolienne d'AMH (Blanchard and Josso 1974). L'équipe de Nathalie Josso, démontra par la suite en 1978, la nature glycoprotéique dimérique de l'AMH (Picard, Tran et al. 1978)

Des anticorps mis au point dans différentes équipes, ont permis de localiser l'AMH dans les gonades des deux sexes. L'AMH a ainsi pu être détectée dans les cellules de Sertoli immatures (Donahoe, Ito et al. 1976 ; Donahoe, Ito et al. 1977 ; Tran, Muesy-Dessole et al. 1977 ; Tran and Josso 1982 ; Hayashi, Shima et al. 1984) et dans les cellules de la granulosa de l'ovaire post-natal (Vigier, Picard et al. 1984 ; Takahashi, Hayashi et al. 1986). L'AMH a été purifiée en 1984 par immunochromatographie (Picard and Josso 1984). Les gènes de l'AMH humain et bovin ont été clonés après obtention de l'ADNc codant pour l'AMH bovine (Cate, Mattaliano et al. 1986 ; Picard, Benarous et al. 1986).

Le gène a ensuite été identifié dans de nombreuses espèces mammaliennes ou non telles que la souris (Munsterberg and Lovell-Badge 1991), le rat (Haqq, Lee et al. 1992), le poulet (Oreal, Pieau et al. 1998), le porc (Lahbib-Mansais, Barbosa et al. 1997), l'alligator (Western, Harry et al. 1999), le tamar wallaby (Pask, Whitworth et al. 2004), le medaka (Morinaga, Saito et al. 2007), le poisson zébre (Schulz, Bogerd et al. 2007) et le pleurodèle (Al-Asaad, Chardard et al. 2013). Le récepteur de type II a été cloné de façon concomittante par deux groupes chez le rat et le lapin (Baarends, van Helmond et al. 1994 ; di Clemente, Wilson et al. 1994). Plus tard il a été identifié dans de nombreuses autres espèces (Imbeaud, Faure et al. 1995 ; Visser, McLuskey et al. 1995 ; Mishina, Tizard et al. 1997). Ce récepteur spécifique est présent sur la membrane cellulaire et permet la liaison de l'AMH. Il a été découvert que l'AMH avait besoin d'un second récepteur pour transduire son signal. Il existe 3 récepteurs de type I permettant à l'AMH d'activer sa voie de signalisation : BMPR-IB (ou ALK6) (Gouédard, Chen et al. 2000), ActR-IA (ou ALK2) (Visser, Olaso et al. 2001 ; Clarke, Hoshiya et al. 2001), et BMPR-IA (ou ALK3) (Jamin, Arango et al. 2002 ; Belville, Jamin et al. 2005). La transduction du signal implique donc un récepteur de type II et un récepteur de type I susceptibles de varier selon le type cellulaire (Josso and di Clemente 2003). Depuis les années 2000, de nombreux travaux ont permis de mieux comprendre le mode d'action et les rôles physiologiques de cette hormone.

2 Le gène de l'AMH

Le gène de l'*AMH* humain est positionné sur le chromosome 19, bande p13.3 (Cohen-Haguenauer, Picard et al. 1987), le gène de l'*Amh* murin sur le chromosome 10 (King, Lee et al. 1991) et le bovin sur le chromosome 7 (Gao and Womack 1997). Il s'agit d'un petit gène de 2.75 kpb comprenant 5 exons. La séquence est riche en bases G et C. Le gène de l'*AMH* humain code pour un ARNm de 1.8 kbp qui présente une partie 5' non transcrite de 10 nucléotides. Le signal de polyadénylation est présent 90 nucléotides après le codon stop TGA (Cate, Mattaliano et al. 1986). Chez le rat, deux ARNm distincts ont été décrits. Ils diffèrent au niveau de la longueur de leurs queues poly-A (Lee, Cate et al. 1992). Un ARNm de 2 kpb est majoritairement présent pendant la vie fœtale au moment de la différenciation testiculaire et diminue dans les derniers stades de la gestation. L'ARNm de 1.8 kpb apparaît au jour 18 après la gestation et est la forme majoritairement détectée après ce stade (Lee, Cate et al. 1992).

3 La protéine

Le gène de l'*AMH* code pour une protéine de 560 acides aminés chez l'homme. Elle présente un domaine C terminal porteur de l'activité biologique et un domaine N terminal dépourvu d'activité intrinsèque. La partie C terminale de 149 acides aminés est très conservée au sein des espèces et on observe une homologie de plus de 30% avec des facteurs de croissance de la famille du TGF- β . L'*AMH* est une glycoprotéine de 140 kDa, composée de deux monomères de 70 kDa chacun, stabilisé par des ponts disulfures (Picard and Josso 1984). Comme beaucoup de molécules de la superfamille du TGF- β , l'*AMH* doit ensuite être clivée en deux dimères N terminal et C terminal pour acquérir sa fonction biologique. Le clivage de l'*AMH* donne naissance à un homodimère N terminal de 110 kDa formé par deux sous-unités de 57 kDa et un homodimère actif C terminal de 25 kDa composé de deux sous-unités identiques de 12,5 kDa. Il a été montré que la partie N terminale de la protéine bien que n'ayant pas d'activité intrinsèque avait pour rôle d'amplifier l'activité de la partie C terminale (Wilson, di Clemente et al. 1993). De façon expérimentale, l'*AMH* recombinante peut être clivée par la plasmine (Pepinsky, Sinclair et al. 1988). Cependant, in vivo, l'enzyme capable de cliver l'*AMH* reste inconnue.

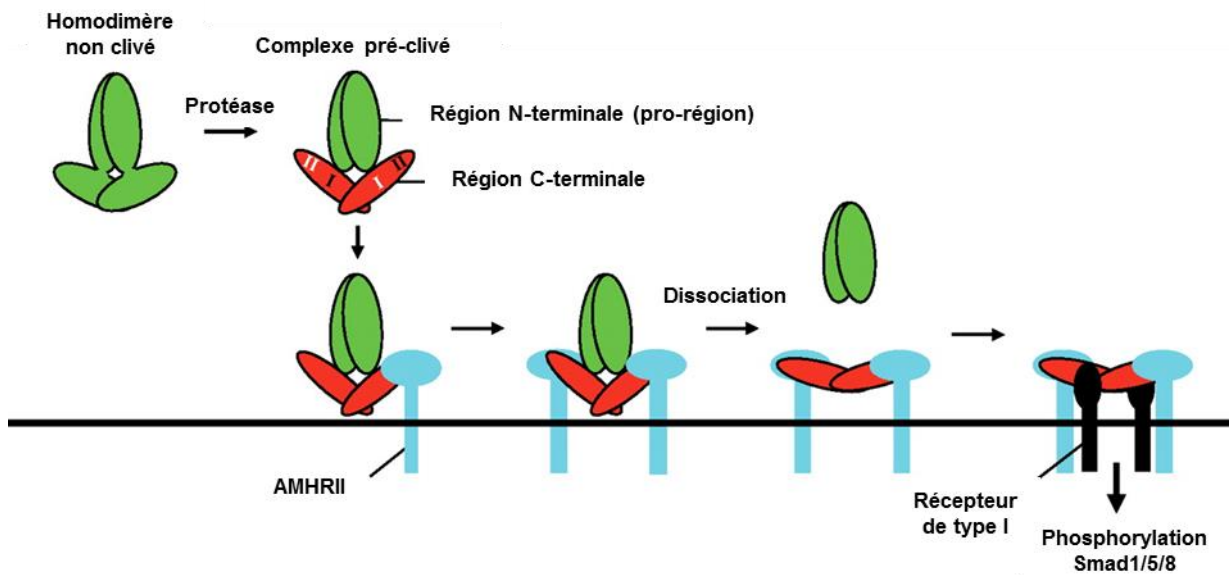


Figure 21 : Modèle de formation du complexe AMH-AMHR-II. Le pré-clivage de l'AMH induit un changement de conformation du domaine C-terminal permettant la liaison de l'AMH à son récepteur de type II spécifique. De la liaison à AMHR-II résulte la dissociation du domaine N-terminal de l'AMH. Il semblerait que cette dissociation se produit avant la liaison des récepteurs de type I, résultat encore non prouvé. Le domaine C-terminal de l'AMH portant l'activité biologique permet la transduction du signal et la phosphorylation des Smad intracellulaires (di Clemente, Jamin et al. 2010).

Des études ont montré que la furine et la prohormone convertase 5 (PC5), deux endoprotéases de la famille des Subtilisin-like proprotein convertases, étaient coexprimées avec l'AMH dans le testicule de rat embryonnaire (Nachtigal and Ingraham 1996). De plus, seule PC5 est capable de cliver cette hormone après co-transfection dans des cellules de mammifères. Ces résultats laissaient penser que l'AMH était clivée sur son lieu de sécrétion. Cependant, d'autres expériences ont montré que seul 5 à 15% d'AMH clivée était présents dans le sérum et le milieu d'incubation des testicules de veaux. Ceci présume d'un clivage potentiel sur le lieu d'action de l'hormone plutôt qu'au niveau des cellules productrices (Nachtigal and Ingraham 1996).

En 2010, l'équipe de Nathalie di Clemente et Richard Cate propose que le clivage intervient suite à l'interaction de l'AMH avec son récepteur AMHR-II (di Clemente, Jamin et al. 2010). Suite à son pré-clivage, les parties N et C-terminales de l'AMH restent associées par des liaisons non covalentes et se fixent sur AMHR-II sous cette forme. La fixation au récepteur induit la dissociation de la pro-région N-terminale et permet de générer le ligand mature (figure 21).

VI Expression et régulation de l'AMH

1 Expression

1.1 Chez le mâle

L'origine sertolienne de la production d'AMH a été démontrée par Nathalie Josso en 1974. En effet, les tubes séminifères seuls, dépourvus ou non de cellules germinales, sont capables de faire régresser les canaux de Müller, (Blanchard and Josso 1974). Chez la souris, l'expression de l'AMH débute à 11.5 jpc dans les cellules de Sertoli et augmente jusqu'à 19.5 jpc. L'expression de l'AMH est très élevée juste après la naissance (Munsterberg and Lovell-Badge 1991). A la puberté, sous l'influence de la testostérone, l'expression de l'AMH va diminuer plus franchement (Rey, Lordereau-Richard et al. 1993 ; Al-Attar, Noel et al. 1997). Chez toutes les espèces étudiées, l'évolution de l'expression de l'AMH est identique (figure 22).

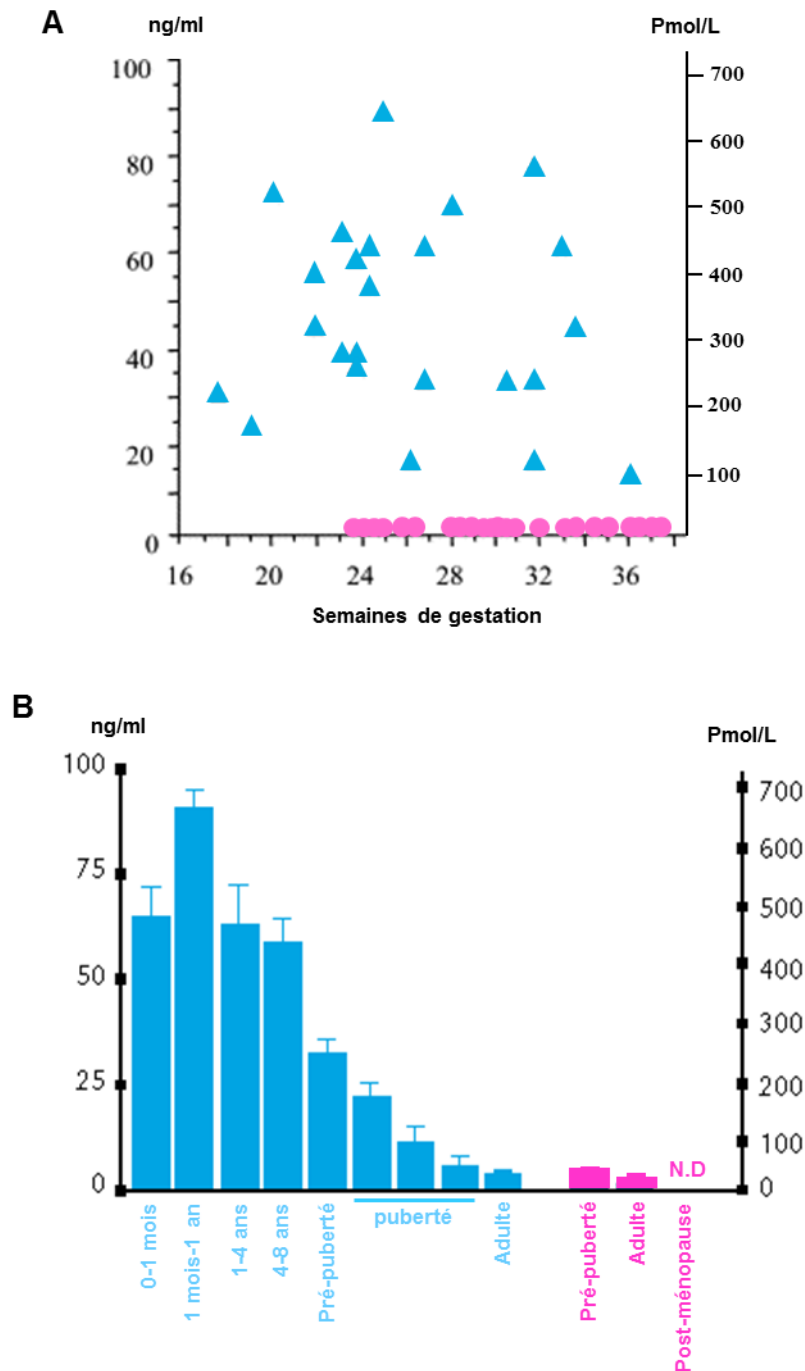


Figure 22 : Variation des taux sérique d'AMH chez l'Homme. A. Pendant la vie fœtale l'AMH est majoritairement exprimée chez le fœtus mâle (▲). L'expression chez le fœtus femelle (●) a été observée à partir de la 36^{ème} semaine de grossesse mais à des niveaux bien inférieurs que ceux observés chez le fœtus mâle. B. Le taux sérique d'AMH va rester élevé jusqu'à la puberté chez le garçon et va diminuer drastiquement au cours de cette période et se maintenir à ce niveau pendant le reste de la vie adulte. Chez la femme, l'AMH s'exprime dans les follicules en croissance en période pré-pubertaire et pendant la vie adulte.

1.2 Chez la femelle

En 1984, Bernard Vigier a montré pour la première fois que l'AMH était synthétisée par les cellules de la granulosa dans l'espèce bovine (Vigier, Tran et al. 1984). Le profil d'expression de l'AMH a été étudié par la suite chez d'autres espèces. On peut citer l'espèce ovine (Vigier, Forest et al. 1989), la ratte (Ueno, Takahashi et al. 1989 ; Baarends, Hoogerbrugge et al. 1995 ; Hirobe, He et al. 1994), la souris (Dutertre, Gouédard et al. 2001 ; Salmon, Handyside et al. 2004), ou encore la femme (Rajpert-De Meyts, Jorgensen et al. 1999 ; Weenen, Laven et al. 2004). Chez la ratte et la souris, l'AMH n'est pas exprimée pendant la vie fœtale mais exclusivement après la naissance. Une étude décrit l'expression de l'AMH dans le stroma ovarien chez la ratte juste après la naissance (Nilsson, Schindler et al. 2011). Cette expression stromale va ensuite disparaître pour commencer dans les cellules de la granulosa. La présence d'AMH est détectée à partir de 4 jours après la naissance dans les cellules de la granulosa des follicules primaires. Au bout de 15 jours, l'expression de l'AMH est détectée dans les follicules du stade primaire au stade petit follicule à antrum (Baarends, Hoogerbrugge et al. 1995 ; Ueno, Takahashi et al. 1989). La production décline dans les grands follicules antraux. Il semblerait cependant que l'AMH soit détectable dans les cellules du cumulus oophorus des follicules supérieurs à 8 mm de diamètre (Baarends, Hoogerbrugge et al. 1995 ; Ueno, Takahashi et al. 1989). Enfin, l'AMH n'est pas détectée dans les follicules atrophiques, le corps jaune, les cellules de la thèque, les ovocytes ou encore les cellules interstitielles du chorion (Baarends, Hoogerbrugge et al. 1995). Une étude chez la ratte, a montré qu'au cours du cycle oestrien, l'expression de l'AMH est constante dans les petits follicules en croissance. Cependant, l'AMH serait également exprimé dans les follicules à antrum plus tardifs (Hirobe, He et al. 1994). Cette expression serait abolie à l'approche de l'oestrus, c'est-à-dire au moment de l'ovulation.

Chez la femme, l'AMH est décelable à partir de la 36^{ème} semaine de grossesse dans les cellules de la granulosa et cela jusqu'à la ménopause (Rajpert-De Meyts, Jorgensen et al. 1999) (figure 22). Une étude menée par l'équipe d'Axel Themmen a montré que le profil d'expression de l'AMH chez des femmes en bonne santé et cyclées régulièrement était identique à celui décrit chez la ratte et la souris (Weenen, Laven et al. 2004). En effet, l'expression de l'AMH débute à partir du stade follicule primaire et est maximale dans les

follicules secondaires et les petits follicules à antrum. L'expression de l'AMH au cours du cycle reste controversée. Des études montrent qu'il n'y aurait pas de variations des niveaux d'AMH au cours du cycle (La Marca, Giulini et al. 2007 ; Streuli, Fraisse et al. 2008). D'autres, au contraire, présentent des résultats montrant des taux plus élevés d'AMH au cours de la phase folliculaire (Wunder, Bersinger et al. 2008 ; Sowers, McConnell et al. 2010).

Une étude montre que l'AMH et son récepteur AMHR-II sont exprimés dans l'endomètre humain et plus particulièrement dans l'endomètre en phase proliférative (Wang, Dicken et al. 2009). De plus, l'expression de l'AMH est augmentée dans cet organe par les oestrogènes et la progestérone. Cette étude initie la recherche des rôles de l'AMH dans l'utérus qui est jusqu'à présent un domaine inexploré. Une partie de mon projet de thèse visait à analyser l'expression de l'AMH dans l'utérus murin et à déterminer des rôles potentiels de cette hormone dans l'utérus. Mes travaux sont présentés dans la partie résultats de ce manuscrit (page 211).

2 Régulation de l'expression de l'*Amh*

2.1 Chez le mâle

a Régulation directe du promoteur

En analysant la région régulatrice potentielle en 5' du gène de l'*Amh*, une équipe a observé une homologie de séquence avec un gène connu, le gène *Sap62* (Dresser, Hacker et al. 1995). Le codon Stop ATG du gène *Sap62* murin se situe 434 pb en amont du site d'initiation de la transcription de l'*Amh*. Ces deux gènes sont transcrits dans le même sens. Le gène *Sap62* code pour une protéine du spliceosome dont l'expression est ubiquitaire. L'*Amh* se situe donc dans une région où la chromatine est dite « ouverte » pour permettre la transcription ubiquitaire du gène *Sap62*. Une étude a montré que pour l'initiation de la transcription de l'*Amh*, seule une région proximale de 370 pb est nécessaire (Beau, Vivian et al. 2001). En revanche pour le maintien de cette expression après la naissance de l'animal, la régulation se ferait dans une région plus distale comprise dans la séquence codante du gène *Sap62*.

La mise en place du dimorphisme sexuel est déterminée par l'expression du gène *Sry* dans les cellules somatiques de la gonade fœtale. *Sry* s'exprime de manière courte et transitoire. Chez la souris mâle, on observe l'expression de *Sry* à 10.5 jpc, elle atteint un pic à

11.5 jpc pour décliner drastiquement 24h après (Hacker, Capel et al. 1995). L'expression de l'*Amh* débute 20 h après le début de l'expression de *Sry* c'est-à-dire au moment du pic d'expression de ce dernier. L'équipe de Haqq en 1994 a montré que SRY pouvait activer un promoteur humain de l'AMH de 114 pb in vitro (Haqq, King et al. 1994). Une mutation du domaine de la liaison à l'ADN de SRY abolit l'expression de l'*Amh* alors qu'une mutation du site non consensus de fixation de *Sry* sur le promoteur de l'*Amh* n'a pas de conséquence sur son expression. Cette étude montre que SRY induit l'expression de l'*Amh* de façon indirecte mais nécessitant une liaison à l'ADN donc l'activation d'autres facteurs.

L'expression de *Sox9* (SRY-related HMG box protein 9) démarre peu après le pic d'expression de *Sry* à 11.5 jpc. Des études in vitro ont montré la nécessité de la liaison de SOX9 à son site spécifique sur le promoteur de l'*Amh* pour initier son expression (De Santa Barbara, Bonneaud et al. 1998). Un modèle de souris dans lequel le promoteur de l'*Amh* a été muté sur le site spécifique de *Sox9* a été généré. Les souris mâles mutantes homozygotes pour ce site présentent une rétention complète des canaux de Müller due à une absence d'expression de l'*Amh* (Arango, Lovell-Badge et al. 1999). SOX9 est donc un activateur essentiel du promoteur de l'*Amh* (figure 23). *Sox9* est exprimé dans beaucoup d'autres tissus qui n'expriment pas l'*Amh*. Il existe donc d'autres facteurs qui doivent moduler l'expression de cette hormone dans les cellules de Sertoli.

Parmi ceux-ci on distingue SF1 (Steroidogenic Factor 1), un récepteur nucléaire orphelin (Shen, Moore et al. 1994). L'invalidation de *Sf1* chez la souris induit une persistance des canaux de Müller chez le mâle (Luo, Ikeda et al. 1994). De plus, une étude in vivo a montré qu'un site intact de *Sf1* est indispensable pour l'expression de l'*Amh* dans les cellules de Sertoli (Giuli, Shen et al. 1997) (figure 23). Une autre étude a montré que la mutation du site de liaison de SF1 entraîne une diminution de l'expression de l'*Amh* (Arango, Lovell-Badge et al. 1999). Cependant, les souris mâles présentent une régression Müllérienne normale.

Il est maintenant admis que plusieurs sites pour SF1 sont présents sur le promoteur de l'*Amh* (Watanabe, Clarke et al. 2000) et que ce facteur agit en synergie avec SOX9 pour activer l'*Amh* pendant la différenciation testiculaire (Schepers, Wilson et al. 2003). SOX8 qui est structuellement proche de SOX9 est également exprimé dans le testicule fœtal et peut agir au même titre que SOX9 pour activer l'expression de l'*Amh*.

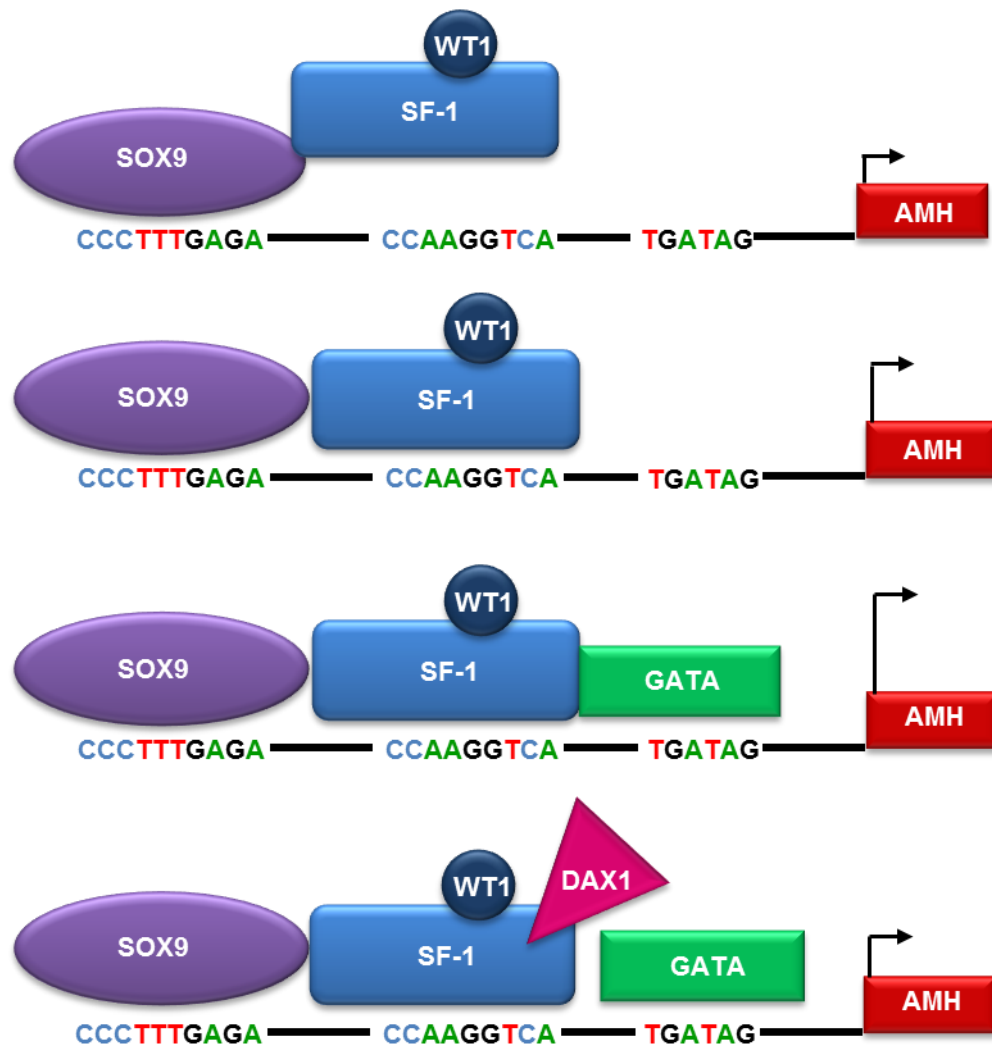


Figure 23 : Régulation directe de l'expression de l'AMH. L'expression maximale de l'AMH nécessite la fixation sur son promoteur des facteurs SOX9, SF1, WT1 et GATA4. Le facteur DAX1 se fixe sur SF1 et inhibe l'expression de l'AMH (Arango, Lovell-Badge et al. 1999).

Un autre facteur de transcription qui coopère avec SOX9 est le facteur GATA4. Parmi les 6 membres de la famille GATA, les cellules testiculaires expriment majoritairement GATA4 pendant la vie fœtale (Tremblay and Viger 2003). L'association de GATA4 à SF1 stimule fortement l'expression de l'*Amh* (figure 23).

WT-1 (Wilms' Tumor 1) est une protéine à doigt de zinc étudiée pour ses mutations provoquant des tumeurs rénales chez l'enfant. D'autres mutations de cette protéine ont également été impliquées dans le syndrome de Denys-Drash provoquant des malformations urogénitales et pouvant engendrer un pseudohermaphrodisme chez des individus 46, XY. WT1 est exprimé dans le testicule fœtal et s'associe à SF1 pour activer l'expression de l'*Amh* (Nachtigal, Hirokawa et al. 1998) (figure 23).

Dax-1 est un gène important pour la différenciation femelle. Il est présent sur le bras court du chromosome X sur le locus DSS (dosage sensitive sex reversal). La duplication des gènes présents dans ce locus chez le mâle induit une réversion sexuelle. *Dax-1* code pour un récepteur nucléaire orphelin. A l'inverse des précédents facteurs, DAX-1 est un répresseur de l'expression de l'*Amh*. En effet, DAX-1 interfère dans la liaison à SF1 de WT-1 (Nachtigal, Hirokawa et al. 1998) et de GATA4 (Tremblay, Robert et al. 2001) (figure 23).

b Régulations indirectes de l'expression de l'AMH

- ***Régulation par les androgènes***

Des études cliniques ont mis en évidence une corrélation négative entre les concentrations d'AMH sériques et celles de testostérone à la puberté. Cette corrélation négative est également observable chez des patients présentant une puberté précoce, caractérisée par une augmentation de la production d'androgènes testiculaires. De plus, des patients souffrant d'un syndrome d'insensibilité aux androgènes présentent, à l'inverse, des taux anormalement élevés d'AMH (Rey, Mebarki et al. 1994). Les preuves expérimentales ont été apportées par l'étude des souris *Tfm* prépubères qui présentent une mutation du récepteur aux androgènes et y sont donc insensibles (Al-Attar, Noel et al. 1997). Ces souris insensibles aux androgènes maintiennent un niveau d'AMH stable au moment de la puberté malgré un taux de testostérone intra-testiculaire haut. La testostérone est donc capable de réguler les niveaux d'AMH circulant chez la souris et chez l'homme.

- **Régulation par les cellules germinales**

Les cellules germinales du testicule régulent négativement l'expression de l'*Amh*. Les cellules germinales produisent la cytokine TNF- α (tumor necrosis factor alpha). Le récepteur du TNF- α est présent sur les cellules de Sertoli (Hong, Park et al. 2003). Le TNF- α va activer NF- κ B dans les cellules de Sertoli productrices d'AMH. NF- κ B va être recruté par SF-1 sur le promoteur de l'*Amh* et inhibe la transactivation de ce dernier par le recrutement d'histones désacétylases (HDAC). La désacétylation de l'ADN induit une compaction de la chromatine qui n'est plus accessible pour les facteurs de transcription.

Un modèle de souris a permis de mettre en évidence le lien entre l'entrée en méiose des cellules germinales mâle à la puberté et la diminution de l'expression de l'*Amh* (Al-Attar, Noel et al. 1997). Les souris XXsyr^b sont des souris mâles normalement virilisées du fait de la translocation d'un fragment du chromosome Y qui porte le gène *Sry*. Ces souris présentent un niveau normal d'androgènes à la puberté. Cependant, la présence de deux chromosomes X et l'absence des gènes du chromosome Y empêche la survenue de la méiose des cellules germinales. A la puberté, on note chez ces souris une diminution de l'expression de l'*Amh* due à la présence de testostérone mais cette diminution est moins importante que chez les souris contrôles. Ce résultat montre que l'entrée en méiose des cellules germinales dans le testicule joue un rôle sur la diminution de l'expression de l'*Amh* à la puberté.

- **Régulation par la FSH**

Le récepteur FSH transduit son signal via un récepteur à 7 domaines transmembranaires et la protéine G_s α intracellulaire. L'activation du signal induit la stimulation de l'adénylate cyclase et l'augmentation de l'AMP cyclique (AMPc) dans le cytoplasme des cellules de Sertoli. L'AMPc active ensuite la protéine kinase A (PKA). La PKA va ensuite phosphoryler la protéine CREB (cAMP response element protein) qui va activer les gènes dont les promoteurs présentent une séquence CRE (cAMP response element).

De la FSH recombinante a été administrée à des souris pré-pubères et une augmentation modérée mais significative de taux d'AMH testiculaire a été observée (Al-Attar, Noel et al. 1997). Pour approfondir l'analyse de l'effet de la FSH sur l'expression de l'*Amh*, une équipe a étudié le modèle de souris transgénique présentant une délétion de la sous-unité β de la FSH. Le taux sérique d'AMH est diminué chez les souris pré-pubères en corrélation avec une

diminution du nombre de cellules de Sertoli et du volume testiculaire. Ces trois paramètres retrouvent une valeur normale après administration chez ces souris de FSH recombinante (Lukas-Croisier, Lasala et al. 2003). L'AMH est un marqueur pertinent du nombre de cellules de Sertoli dans le testicule pré-pubère. Les auteurs se sont également intéressés à la façon dont la FSH régule l'expression de l'*Amh*. A la différence de la plupart des gènes régulés par la PKA, le promoteur de l'AMH ne présente pas de séquence CRE sur son promoteur. La FSH ne régule donc pas l'expression de l'*Amh* par la voie classique de la PKA. Des éléments de réponse pour les facteurs NF- κ B et AP2 ont été trouvés sur le promoteur de l'*Amh*. La PKA va phosphoryler les facteurs AP2 et I κ B ce qui va permettre la libération du facteur NF- κ B. AP2 et NF- κ B transloquent au noyau et augmentent l'expression de l'*Amh*. De plus, l'activation de la PKA augmente aussi la prolifération cellulaire des cellules de Sertoli augmentant également de ce fait la production d'AMH (Lukas-Croisier, Lasala et al. 2003).

2.2 Chez la femelle

a Régulation directe du promoteur

SOX9 régule l'expression de l'*Amh* dans les cellules de Sertoli fœtales mais ce facteur n'est pas exprimé dans les cellules de la granulosa adultes. A l'inverse, on retrouve l'expression de *Sfl*, *Gata4*, *Wt1* et *Dax1*. Il a été montré que GATA4 pouvait transactiver le promoteur de l'*Amh* dans les cellules de la granulosa et ce processus est régulé négativement par un facteur appelé FOG2 (Friend of GATA2) (Anttonen, Ketola et al. 2003). La régulation de l'*Amh* chez la femelle reste proche de celle du mâle mais l'absence d'expression des gènes du déterminisme mâle empêche l'expression de l'*Amh* pendant la vie fœtale pour éviter la régression des canaux de Müller.

b Régulation indirecte de l'expression de l'AMH

- ***Régulation par la FSH, la LH et l'oestradiol***

Des études ont montré l'importance de la FSH, de la LH et de l'oestradiol sur la régulation de l'expression de l'*Amh* (Grynberg, Pierre et al. 2012 ; Taieb, Grynberg et al. 2011). Dans la lignée de cellules de la granulosa murine KK1, la FSH stimule l'expression de l'*Amh* tandis que l'oestradiol l'inhibe via la liaison aux récepteurs Er β (Grynberg, Pierre et al. 2012). La LH seule ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de l'*Amh* mais les auteurs

observent un effet synergique lorsque les cellules KK1 sont stimulées avec de la LH et de la FSH simultanément (Taieb, Grynberg et al. 2011). Il a également été montré que la FSH active l'expression de l'*Amh* dans des cellules de la granulosa humaines en culture primaire alors que l'oestradiol l'inhibe (Taieb, Grynberg et al. 2011 ; Grynberg, Pierre et al. 2012). Xu et al ont également observé une augmentation de l'expression de l'*Amh* par des follicules secondaires humains cultivés en présence de FSH (Xu, Barrett et al. 2009). Une hypothèse a pu être décrite sur la régulation de l'expression de l'*Amh* au cours de la folliculogenèse par la FSH et l'oestradiol. L'*Amh* s'exprime essentiellement du stade follicule primaire au stade petit follicule à antrum. Dans les petits follicules à antrum, la FSH stimule l'expression de l'*Amh* alors que l'expression faible d'oestradiol ne permet pas de réguler négativement cette hormone. En revanche, dans les follicules à antrum plus larges, l'expression de l'oestradiol augmente petit à petit exerçant son rétrocontrôle négatif sur l'*Amh* (Grynberg, Pierre et al. 2012). L'effet de la FSH sur l'expression de l'*Amh* peut varier selon les espèces. L'étude de Rico et al montre un effet inhibiteur de la FSH sur l'expression de l'*Amh* dans les cellules de la granulosa bovine des petits follicules en croissance (Rico, Medigue et al. 2011). La FSH n'a plus d'effet sur les gros follicules antraux.

Une étude s'est intéressée à la régulation de l'*Amh* par les gonadotropines dans des cultures primaires de cellules de la granulosa de femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (Pierre, Peigne et al. 2013). Ce syndrome est entre autre caractérisé par une augmentation de la sécrétion d'AMH. Deux groupes de femmes ont été analysés : les normo-ovulantes et les oligo/anovulantes. Les auteurs observent que la FSH augmente l'expression et la sécrétion de l'AMH chez les patientes témoins et chez les patientes SOPK des deux groupes. En revanche, la LH n'augmente l'expression et la sécrétion de l'AMH que des patientes SOPK oligo/anovulantes. La LH pourrait être responsable de l'hyper sécrétion d'AMH chez ces patientes.

- ***Régulation par les BMP***

Dans l'ovaire humain, le facteur BMP6 est faiblement exprimé dans les follicules primaires et secondaires alors qu'il est fortement détecté dans les cellules de la granulosa des follicules antraux sains (Shi, Yoshino et al. 2009). L'expression de BMP6 suit donc le même profil que l'AMH. La stimulation d'une culture de cellules de la granulosa humaines par BMP6 induit une augmentation de l'expression de l'*Amh*. Une autre étude a montré que BMP6 et BMP4 induisent une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'AMH par les

cellules de la granulosa des gros follicules antraux (5 à 10 mm) bovins (Rico, Medigue et al. 2011). La FSH inhibe l'augmentation de l'expression de l'*Amh* induite par les BMPs. Les résultats de cette étude suggèrent qu'il existe des effets opposés entre la FSH et les BMP sur l'expression de l'*Amh* dans les cellules de la granulosa. Cependant, le mode d'action de ces deux facteurs reste à l'heure actuelle inconnu.

VII Rôles physiologiques de l'AMH

1 Chez le mâle

Les expériences d'Alfred Jost ont permis de mettre en évidence le rôle physiologique le plus connu de l'AMH qui est son action sur la régression des canaux de Müller pendant la vie fœtale (Jost 1953). Chez l'homme, des mutations de l'*AMH* sont associées au syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) encore appelé syndrome de l'homme à utérus. Il s'agit d'un pseudo-hermaphrodisme masculin qui se caractérise par la présence de dérivés Müllériens comme les trompes et l'utérus.

Ces hommes présentent cependant des organes génitaux externes normaux. Environ 50% des cas de PMDS sont dus à des mutations du gène de l'*AMH* (Josso, Rey et al.). La transmission se fait généralement de façon récessive. Tous les exons à l'exception du 4 ont été identifiés potentiellement porteurs de mutations. Celles-ci sont de type faux sens ou non-sens comme c'est le cas pour la première mutation identifiée en 1991 (Knebelmann, Boussin et al. 1991).

Les connaissances sur l'AMH ont été enrichies par le développement de la souris génétiquement déficiente pour l'*Amh* (souris KO *Amh*) (Behringer, Finegold et al. 1994). Les souris mâles KO *Amh* présentent des testicules complètement descendus et produisent un sperme fonctionnel. Cependant, ils possèdent un utérus dû à l'absence de dégradation des canaux de Müller, qui interfère avec le transport du sperme. Ces mâles sont donc stériles. On observe également chez ces mâles une hyperplasie des cellules de Leydig permettant de conclure sur un effet de régulation négative de l'*Amh* sur ce type cellulaire (Behringer, Finegold et al. 1994). Un modèle de souris surexprimant l'*Amh* existe également et a permis de confirmer l'effet de l'AMH sur les cellules de Leydig (Behringer, Cate et al. 1990). Dans ce modèle, une diminution importante du nombre de cellules de Leydig est observée. De plus, les souris mâles qui produisent de l'AMH de façon élevée et continue ne présentent pas de cellules de Leydig matures (Racine, Rey et al. 1998). Une diminution du taux sérique de testostérone est également observée dans ce modèle.

Il a également été montré que l'AMH diminuait l'activité de l'aromatase dans les cellules de Sertoli de rat fœtales et post-natales ainsi que la production de testostérone dans les cellules de Leydig fœtales (Rouiller-Fabre, Carmona et al. 1998). L'équipe de Patricia K. Donahoe en 1999 a montré que l'AMH inhibait l'expression de *p450c17* dans deux lignées cellulaires de Leydig, les lignées MA-10 et R2C (Teixeira, Fynn-Thompson et al. 1999). Ceci pourrait expliquer la diminution de production de testostérone par les cellules de Leydig exposées à de fortes doses d'AMH continue pendant la vie fœtale.

Parmi les rôles de l'AMH, il a été suggéré un potentiel rôle inhibiteur sur le développement pulmonaire du rat mâle fœtal (Catlin, Tonnu et al. 1997). Le poumon et la gonade fœtale étant anatomiquement proches au moment de l'expression de l'*Amh* chez le mâle, il serait possible que l'AMH gonadique, déjà connue pour faire régresser les canaux de Müller, empêche également le développement des bronchioles. Cet effet n'a jamais été confirmé. Par ailleurs, l'AMH pourrait également inhiber la croissance des cellules tumorales prostatiques via l'activation de la voie NFkB (Hoshiya, Gupta et al. 2003) (Segev, Hoshiya et al. 2002).

Plus récemment, la détection de l'AMH et de son récepteur dans les neurones a permis de montrer son rôle régulateur de l'expression de la neuroserpine (Lebeurrier, Launay et al. 2008). Il avait également été mis en évidence que l'AMH pouvait agir sur la survie dans les motoneurones (Wang, Koishi et al. 2005).

2 Chez la femelle

L'*Amh* est exprimée après la naissance par les cellules de la granulosa ovariennes. L'expression ne varie pas au cours du cycle dans les petits follicules en croissance (follicules primaires jusqu'au stade petit follicule à antrum). Il a été montré chez la ratte que l'*Amh* pouvait également être exprimée dans les follicules à antrum plus matures et dans le follicule de de Graaf (Hirobe, He et al. 1994). Cependant à l'approche de l'oestrus l'expression de l'*Amh* diminue dans ces follicules. Ceci pourrait indiquer un rôle de l'AMH dans la régulation de la sélection et la maturation folliculaire (Baarends, Hoogerbrugge et al. 1995). De plus, cette observation est en accord avec une étude précédente qui montre que l'AMH inhiberait la reprise de la méiose de l'ovocyte (Takahashi, Koide et al. 1986). L'hypothèse sous-jacente serait qu'une diminution de l'expression de l'*Amh* chez la ratte au moment de l'oestrus permettrait la reprise de la méiose et donc l'ovulation d'un ovocyte compétent pour la fécondation.

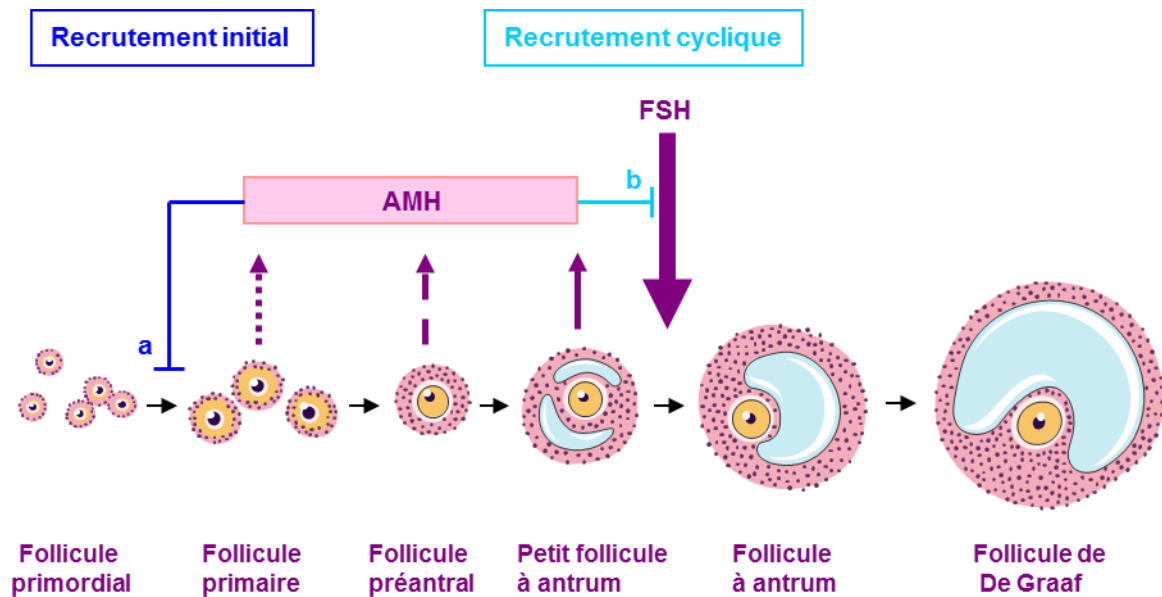


Figure 24 : Rôle de l'AMH dans la folliculogénèse. Chez la femelle, l'AMH est exprimée dans les cellules de la granulosa des petits follicules en croissance du stade primaire au stade petit follicule à antrum. L'expression de l'AMH disparaît à des stades plus tardifs. Seule une faible expression dans les cellules du cumulus reste observable. L'AMH présente un rôle de régulation négative sur le recrutement initial des follicules (a) ainsi que sur la sélection du follicule dominant (b). L'AMH réduit la réponse des follicules à la FSH pendant le recrutement cyclique (Broekmans, Visser et al. 2008).

L'étude des souris femelle KO *Amh* a permis de mettre en évidence un rôle de l'AMH sur la folliculogénèse. L'équipe d'Axel Themmen a montré en 1999 que l'AMH inhibait le recrutement initial des follicules primordiaux (Durlinger, Kramer et al. 1999) (figure 24). En effet, les follicules primordiaux ont été comptés chez des souris contrôles et KO *Amh* de 25 jours, 4 et 13 mois. Les souris KO *Amh* de 4 et 13 mois présentent significativement moins de follicules primordiaux que les souris contrôles. La même équipe deux ans plus tard a montré que l'AMH diminuait la sensibilité à la FSH des follicules en croissance. L'AMH inhibe de ce fait le recrutement cyclique (Durlinger, Gruijters et al. 2001) (figure 24).

Il a été montré que l'AMH pouvait également inhiber l'assemblage des follicules primordiaux. Des ovaires de rat prélevés juste après la naissance ont été incubés pendant 2 jours avec de l'AMH. Ces ovaires présentent un nombre inférieur de follicules primordiaux par rapport aux ovaires contrôles (Nilsson, Schindler et al. 2011). De plus, l'analyse du transcriptome de ces ovaires montre une dérégulation de certains gènes important pour la mise en place du pool de follicules primordiaux.

Il a été montré que les ovocytes étaient capables de réguler positivement l'expression de l'*Amh* en fonction de leur stade de développement (Salmon, Handyside et al. 2004). L'AMH produite par les cellules de la granulosa des petits follicules en croissance inhibe l'entrée en croissance des follicules primordiaux. En augmentant l'expression de l'*Amh* dans les cellules de la granulosa des follicules en croissance, les ovocytes participeraient donc indirectement à la régulation du pool de follicules primordiaux.

Par ailleurs, il a été montré un rôle inhibiteur de l'AMH sur la croissance de lignées ovariennes et utérines. Cet aspect est développé dans le chapitre suivant.

3 L'AMH en clinique chez la femme

3.1 Procréation médicalement assistée

Chez la femme, des études ont montré que les taux d'AMH étaient corrélés avec la réserve folliculaire qui détermine le taux de succès lors des tentatives de procréation médicalement assisté (PMA) (van Rooij, Broekmans et al. 2002). Dans leur première étude chez des femmes volontaires, ces auteurs ont montré que les taux sériques d'AMH diminuaient dans le temps, et qu'il existait une étroite corrélation entre ce taux et le nombre de follicules déterminés lors d'échographies trans-vaginales. Dans une seconde étude chez des

patientes suivant un protocole de stimulation ovarienne pour une PMA, ils ont observé une bonne corrélation entre les taux sériques d'AMH, le nombre d'ovocytes ponctionnés et le succès de la tentative de PMA.

Dans une étude longitudinale parmi 41 femmes en pré-ménopause normo-ovulantes et 13 femmes ménopausées, il a été observé que les taux d'AMH diminuaient significativement au cours du temps (de Vet, Laven et al. 2002). Les concentrations d'AMH varient de 2,1 ng/mL (écart 0,1-7,4 ng/mL) à 1,3 ng/mL (écart 0,0 - 5,0 ng/mL) entre les deux dosages successifs chez les femmes en pré-ménopause contrairement aux autres marqueurs de l'ovulation (FSH, inhibine B, estradiol). Les concentrations d'AMH sont corrélées avec le nombre de follicules antraux détectés à l'échographie et l'âge de la patiente. Pour ces auteurs le dosage d'AMH représenterait un marqueur prédictif de l'âge ovarien.

Dans une étude rétrospective sur des sérums congelés provenant de femmes ayant eu une tentative de PMA, l'intérêt des dosages d'AMH au 3^{ème} jour du cycle a été mis en évidence (Seifer, MacLaughlin et al. 2002). Les 28 femmes ayant moins de 6 ovocytes ponctionnés présentaient des concentrations sériques d'AMH de $1,0 \pm 0,4$ ng/mL. En comparaison les taux d'AMH chez les 79 patientes ayant plus de 11 ovocytes ponctionnés étaient 2 à 2,5 fois plus élevés ($2,5 \pm 0,3$ ng/mL). Ces données préliminaires montrent la relation possible entre le taux d'AMH au 3^{ème} jour et le nombre d'ovocytes ponctionnés.

Dans une étude, Fanchin et al. (2003) ont montré qu'un taux d'AMH au 3^{ème} jour du cycle était mieux corrélé avec le nombre de follicules antraux que les taux d'inhibine B ou de FSH (Fanchin, Schonauer et al. 2003). Dans une publication plus récente, il s'est avéré possible de doser à n'importe quel jour du cycle le taux d'AMH (Fanchin, Mendez Lozano et al. 2007). La nette supériorité de l'AMH en termes de prédictivité de grossesse sur l'ensemble des autres marqueurs associés est maintenant reconnue. Par ailleurs, il semblerait que le taux d'AMH soit un bon reflet de la qualité ovocytaire (Hazout 2006).

3.2 AMH et cancer

a Cancer des cellules de la granulosa

Le cancer des cellules de la granulosa (CGT) représente 3% des tumeurs ovariennes mais fait partie des cancers les plus agressifs. Il a été montré dans les années 2000 que les personnes atteintes de CGT présentaient une altération dans la sécrétion de l'AMH. Plus

précisément, la concentration sérique d'AMH augmente chez ces femmes. L'AMH est donc un bon marqueur du cancer des cellules de la granulosa. Le dosage de cette hormone après un traitement du cancer (par chirurgie ou par chimiothérapie) est également utilisé comme marqueur de récurrence (Rey, Lhomme et al. 1996).

b Effet anti-cancéreux de l'AMH

L'AMH pourrait avoir des applications cliniques dans le traitement de certains cancers. En effet, l'AMH induit la régression des canaux de Müller qui sont issus d'un précurseur commun avec l'épithélium de surface de l'ovaire dont la prolifération peut être à l'origine de cancer (La Marca and Volpe 2006). L'effet de l'AMH sur la régression des canaux de Müller se fait par la liaison de l'hormone à son récepteur de type II. AMHR-II est exprimé dans de nombreuses lignées de cellules de la granulosa humaines cancéreuses (Masiakos, MacLaughlin et al. 1999) et il a été montré que la croissance de ces lignées était inhibée par une exposition à de l'AMH recombinante.

De nombreuses autres études ont également démontré l'effet anti-prolifératif de l'AMH sur des lignées ou des cellules primaires cancéreuses ovariennes, ou encore sur des tumeurs in vivo (Chin, Parry et al. 1991 ; Ha, Segev et al. 2000 ; Stephen, Masiakos et al. 2001). Dans l'étude de Stephen et al, des souris ont été transplantées au niveau de l'ovaire avec un polymère délivrant des doses supra-physiologiques d'AMH. Une semaine après cette première opération, des cellules tumorales humaines IGROV-1 ont été implantées sous la capsule rénale. Les auteurs ont comparé la croissance tumorale 15 jours plus tard. La croissance des tumeurs est significativement diminuée chez les souris préalablement transplantées avec le polymère d'AMH (Stephen, Masiakos et al. 2001).

3.3 Le syndrome des ovaires polykystiques

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est une maladie assez commune touchant de 5 à 10% des femmes en âge de procréer. En 2004 à Rotterdam, s'est tenue une conférence de consensus pour déterminer précisément les symptômes permettant de diagnostiquer un SOPK. Trois critères ont été retenus comme étant des marques du SOPK : une oligoaménorrhée ou une aménorrhée complète accompagnée de dysovulation ou anovulation, une hyperandrogénie et la présence de kystes ovariens (Broekmans, Visser et al. 2008). De plus, les femmes présentant un SOPK souffrent souvent d'autres anomalies métaboliques incluant l'obésité ou encore la résistance à l'insuline.

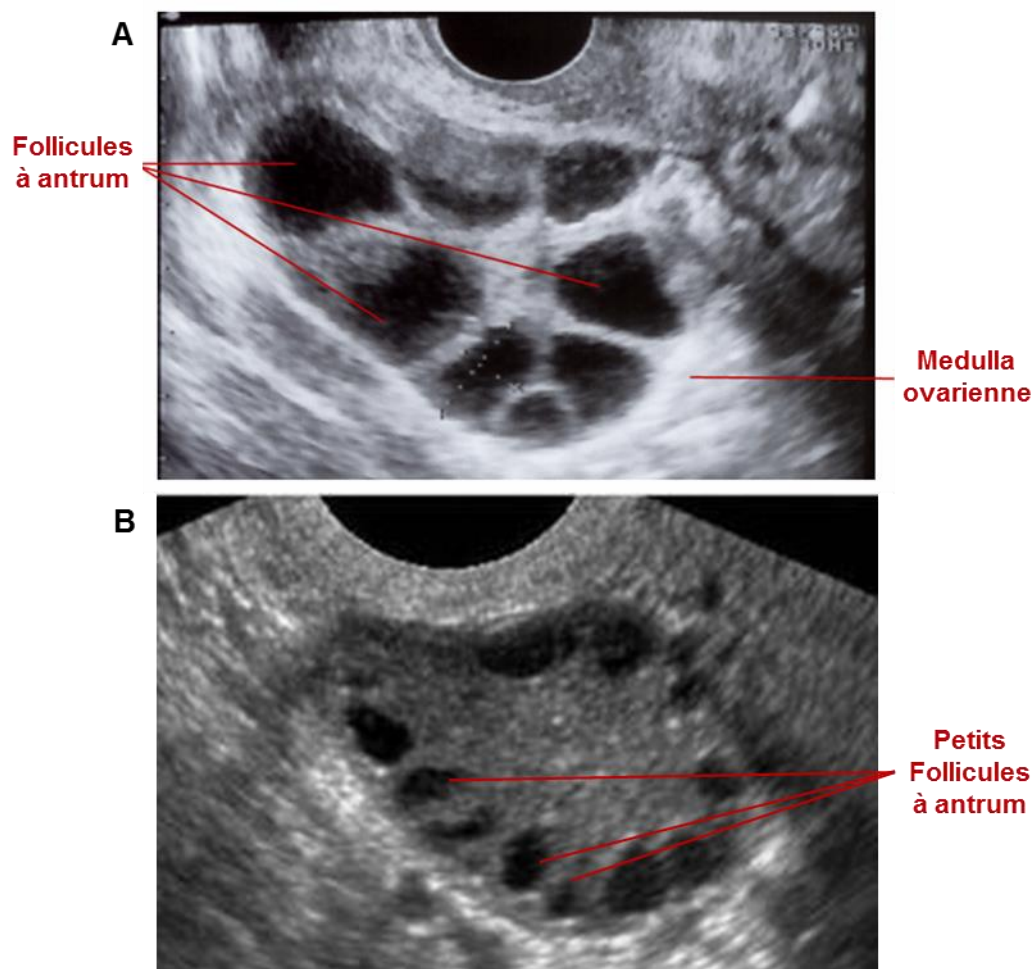


Figure 25 : Syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). L'apparition de kystes ovariens est une des marques majeures de ce syndrome. On observe dans l'ovaire polykystique une accumulation de petits follicules en croissance. Dans l'ovaire sain (A), on observe à l'échographie des grands follicules à antrum reflétant le bon déroulement de la maturation folliculaire. Dans l'ovaire polykystique (B) on note uniquement la présence de petits follicules à antrum. Dans l'ovaire polykystique, le recrutement folliculaire est accru et la folliculogénèse terminale abolie.

A l'heure actuelle, la physiopathologie du SOPK reste mal comprise. Les causes du SOPK sont probablement multifactorielles comprenant une part génétique et une part environnementale. La morphologie de l'ovaire polykystique (OPK) est cependant bien établie avec une augmentation importante du nombre de petits follicules en croissance (figure 25). Il semblerait que d'une part le recrutement folliculaire soit accru et d'autre part que la croissance terminale soit bloquée (Jonard and Dewailly 2004).

Des taux anormalement élevés d'androgènes semblent être responsables de l'excès de petits follicules en croissance dans l'OPK. L'hyperandrogénie pourrait être expliquée par l'effet de plusieurs facteurs sur l'activité des cellules thécales. Chez les SOPK, on observe une élévation de la concentration sérique de LH due à une augmentation de la pulsatilité de la GnRH. En effet, chez les femmes SOPK, les pulses de LH sont plus nombreux et plus longs (Taylor, McCourt et al. 1997). La LH étant impliquée dans la stimulation de la stéroïdogénèse des cellules thécales, ceci explique l'augmentation de la production d'androgènes. La mise au point de culture de cellules de la thèque a permis de mieux comprendre les dérégulations d'expression des enzymes de la stéroïdogénèse chez les femmes SOPK. Il a été montré par différentes techniques que les cellules de la thèque isolées à partir d'OPK présentaient une augmentation de l'expression de *CYP17* (Cytochrome P450 17alpha hydroxylase/17,20 lyase), *CYP11A1* (P450scc) ou encore *HSD3B2* (3beta-hydroxysteroid dehydrogenase). En revanche, l'expression de *StAR* (Steroidogenic acute regulatory protein) et de *HSD17B* (17beta-hydroxysteroid dehydrogenase) ne semble pas affectée (Wickenheisser, Nelson-DeGrave et al. 2006). L'augmentation de certaines enzymes de la stéroïdogénèse dans les cellules de la thèque des femmes SOPK explique l'augmentation de la production des androgènes.

La thèque, qui produit les androgènes, est l'acteur majoritairement dérégulé dans le SOPK. Cependant, les cellules de la granulosa semblent avoir leur rôle à jouer. Les cellules de la granulosa produisent de l'inhibine qui permet entre autre la régulation de la production de la FSH. Il a été montré que de l'inhibine A recombinante était capable d'augmenter la production d'androgènes de cellules de la thèque en culture (Hillier, Yong et al. 1991). De plus, les femmes touchées par le SOPK présentent un taux circulant d'inhibine α supérieur aux femmes témoins (Pigny, Cortet-Rudelli et al. 2000).

L'AMH, produite par les cellules de la granulosa interviendrait également dans la

dérégulation de la stéroïdogénèse dans le syndrome des OPK. En effet, il a été montré que l'AMH inhibait l'expression de l'aromatase et du récepteur LH dans les cellules de la granulosa (di Clemente, Goxe et al. 1994), inhibant de ce fait la conversion des androgènes en œstrogène. Les femmes présentant un SOPK ont un nombre accru de follicules en croissance dans l'ovaire qui sont les follicules producteurs d'AMH. La surexpression de l'AMH chez ces femmes pourrait expliquer l'accumulation d'androgènes due à une activité réduite de l'aromatase.

L'AMH agit différemment sur la stéroïdogénèse mâle et femelle. Chez le mâle, l'AMH diminue également l'expression d'enzymes de la stéroïdogénèse dans le testicule (Racine, Rey et al. 1998) (Messika-Zeitoun, Gouédard et al. 2001) (Laurich, Trbovich et al. 2002), induisant l'inhibition de la production d'androgènes.

Les femmes SOPK présentent une accumulation de petits follicules en croissance mais on note également un défaut de sélection du follicule dominant ce qui aboutit dans la plupart des cas à une anovulation. Chez les femmes SOPK, le niveau sérique d'AMH est 2 à 3 fois plus élevé que chez les femmes normales. L'AMH en surexpression bloque la sélection du follicule dominant. Le niveau sérique d'AMH peut indiquer ou confirmer aux cliniciens la présence d'un SOPK (Broekmans, Visser et al. 2008).

VIII Gènes cibles de l'AMH

L'AMH est un ligand extracellulaire. Suite à la fixation de l'AMH sur ses récepteurs de type I et II, les acteurs intracellulaires de sa voie canonique (Smad1/5/8) ou de ses voies alternatives (β -caténine, NF- κ B) vont être activés. Ces facteurs vont ensuite transloquer dans le noyau pour induire la régulation de certains gènes cibles.

1 Dans le testicule

L'étude des souris surexprimant l'AMH, encore appelée MT-hAMH, a permis de mettre en évidence une baisse du niveau de testostérone sérique (Racine, Rey et al. 1998). L'expression de certaines enzymes de la stéroïdogénèse a été testée sur les testicules isolés de ces souris mutantes. Les niveaux d'expression des enzymes P450scc (*Cyp11a*), 3 β -HSD (*Hsd3b1*) et P450C17 (*Cyp17a*) sont plus bas dans les testicules des souris surexprimant l'AMH. Les cellules de Leydig ont été isolées à partir de testicules de 20 jours et elles ont

ensuite été stimulées avec de l'AMH recombinante. Les auteurs notent des résultats comparables à ceux obtenus *in vivo* à savoir, une diminution de l'expression des enzymes P450scc, 3 β -HSD et P450c17 (Racine, Rey et al. 1998). Le récepteur à la LH également exprimé dans les cellules de Leydig en culture voit son expression diminuer après stimulation à l'AMH.

Les cellules SMAT-1 ont été stimulées 3 jours avec de l'AMH et une diminution de l'expression de *Cyp11a* d'environ 50% a été observée. Ces mêmes cellules ont été transfectées avec le rapporteur *Amhr2-luc* puis stimulées à l'AMH pendant 40h. Une diminution de l'expression de la luciférase de près de 50% a également été notée. Dans la lignée de cellules de Sertoli SMAT-1, les expériences précédentes montrent que l'AMH régule l'expression de *Cyp11a* codant pour l'enzyme P450scc et de son propre récepteur *Amhr2* (Messika-Zeitoun, Gouédard et al. 2001).

2 Dans l'ovaire

A l'heure actuelle, seuls peu de gènes cibles de l'AMH ont été décrit dans cet organe. Bernard Vigier en 1989 a montré que l'AMH réduisait l'activité de l'aromatase (*Cyp19a1*) dans l'ovaire fœtal de brebis et de ratte (Vigier, Forest et al. 1989). L'activité de l'aromatase est analysée en mesurant la capacité de l'enzyme à transformer de la testostérone tritiée en oestradiol. Cette activité est très nettement diminuée dans les ovaires fœtaux mis en culture en présence d'AMH. Ceci induit même une réversion sexuelle due aux fortes concentrations de testostérone. Il a été montré que l'AMH pouvait réguler négativement l'expression des gènes *Cyp19a1* et *Lhcgr* préalablement stimulés à l'AMPc (di Clemente, Goxe et al. 1994) dans les cellules de la granulosa de lapine et de truie.

La découverte de nouveaux gènes cibles dans les cellules de la granulosa ovarienne constitue une partie de mon projet de thèse. Les résultats sont présentés dans un chapitre ultérieur de ce manuscrit (page 183).

3 Dans les autres organes

Dans l'étude menée par l'équipe de Lebeurrier en 2008, il a été montré que l'AMH augmentait la transcription et la traduction de la neuroserpine induisant une survie neuronale. L'expression de la neuroserpine diminue chez la souris KO *Amhr2* et le promoteur de ce gène présente un SBE (Smad binding element) ce qui permet de supposer que ce gène peut-être

régulé directement par les Smads (Lebeurrier, Launay et al. 2008).

L'administration d'AMH à des souris induit l'activation de la voie NF- κ B et l'expression du gène *Iex1* dans la glande mammaire (Segev, Hoshiya et al. 2001) et la prostate (Segev, Hoshiya et al. 2002).

Une étude en 2007 a montré que l'AMH pouvait augmenter l'expression du gène *GRO- β* dans les cellules cancéreuses du sein (Gupta, Yeo et al. 2007), participant ainsi à l'inhibition de la croissance tumorale.

IX Voies de signalisation de l'AMH

1 Récepteur de type II de l'AMH : AMHR-II

1.1 Gène et protéine

Chez l'Homme, *AMHR2* est localisé sur le chromosome 12 et est composé de 11 exons répartis sur plus de 8 kb (Visser, McLuskey et al. 1995). Les trois premiers exons code pour la partie extra-cellulaire de la protéine, le quatrième pour la partie transmembranaire et enfin les sept derniers pour le domaine kinasique intra-cellulaire. Des sites pour Sp1, SOX, SF-1 et GATA ont été trouvés sur le promoteur de ce gène (Josso and Clemente 2003). L'ARNm correspondant code pour une protéine de 573 acides aminés pour 82 kD. Chez le lapin, l'exon 2 subit un épissage alternatif. Cet épissage n'est pas retrouvé chez l'Homme ni chez les rongeurs. Le domaine extracellulaire de cette protéine, domaine de liaison du ligand, porte deux sites potentiels de glycosylation. L'activité kinasique portée par le domaine intracellulaire reste faible tant que le récepteur de l'AMH, AMHR-II, n'est pas complexé avec un récepteur de type I.

Chez l'homme, le syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) est associé, dans 35% des cas, à des mutations du gène *AMHR2*. De la même façon que pour le gène de l'AMH, la majorité des exons (à l'exception de l'exon 4 qui code pour le domaine transmembranaire) du gène *AMHR2* ont été identifiés comme potentiellement porteurs de mutations. La première mutation identifiée engendre un épissage qui génère deux ARN messagers (court et long) (Imbeaud, Faure et al. 1995). La plupart des mutations sont peu fréquentes à l'exception d'une délétion de 27 paires de bases dans l'exon 10 qui affecte environ

la moitié des familles étudiées (Imbeaud, Belville et al. 1996).

1.2 Expression

Amhr2 est exprimé dans les cellules mésenchymateuses des canaux de Müller pendant la vie fœtale (Arango, Kobayashi et al. 2008). Les souris KO pour *Amhr2* présentent le même phénotype que les souris KO pour l'*Amh* à savoir une rétention des canaux de Müller (Mishina, Rey et al. 1996). Ceci a permis de montrer que le récepteur AMHR-II est le récepteur unique et spécifique de l'AMH. La lignée de cellules de Sertoli immatures, SMAT-1, exprime l'*Amh* ainsi que son récepteur de type II (Dutertre, Rey et al. 1997). Les cellules de Sertoli fœtales et post-natales expriment également *Amhr2*. Une étude a également mis en évidence la présence du récepteur de type II de l'AMH dans les cellules de Leydig (Racine, Rey et al. 1998).

Amhr2 est exprimé par les cellules de la granulosa fœtales et post-natales (Baarends, van Helmond et al. 1994). La présence du récepteur de type II a également été décrite dans les cellules de la thèque interne de l'ovaire de rat (Ingraham, Hirokawa et al. 2000). Le récepteur de l'AMH est présent dans le myomètre utérin (Arango, Kobayashi et al. 2008) et également dans l'utérus gravide (Teixeira, He et al. 1996).

L'expression du récepteur de type II spécifique de l'AMH a également été décrit dans les motoneurones (Lebeurrier, Launay et al. 2008 ; Wang, Koishi et al. 2005).

1.3 Régulation

a Régulation directe du promoteur

Il existe peu de données sur la régulation du récepteur spécifique de l'AMH. En 2007, une équipe s'est intéressée au rôle de WT1 sur l'expression d'*Amhr2* (Klattig, Sierig et al. 2007). *Amhr2* n'est pas exprimé dans la crête urogénitale des souris KO *Wt1*. De plus, *Wt1* et *Amhr2* présentent le même profil d'expression pendant la vie embryonnaire au moment de la mise en place et de la régression des canaux de Müller. Enfin, cette étude montre que *Wt1* lie le promoteur d'*Amhr2* in vitro et régule son expression. Le profil d'expression de *Wt1* est également similaire à celui d'*Amhr2* dans l'ovaire adulte ce qui peut laisser supposer que ce facteur joue un rôle dans la régulation de l'expression du récepteur de l'AMH dans l'ovaire adulte (Klattig, Sierig et al. 2007). Chez l'homme, De Santa Barbara et al ont démontré que le

facteur SF-1 agissait, in vitro, comme un activateur de l'expression d'*Amhr2* (de Santa Barbara, Moniot et al. 1998).

***b* Régulation indirecte**

Une étude a montré que l'expression de *Wnt7a* dans l'épithélium du canal de Müller est nécessaire à l'expression du récepteur de type II de l'AMH dans le mésenchyme (Parr and McMahon 1998). En effet, les souris mâles KO pour *Wnt7a* conservent leurs canaux de Müller du fait de l'absence d'AMHR-II dans le mésenchyme.

La LH et l'AMPc réduisent l'expression d'*Amhr2* dans des cellules de la granulosa en culture primaire de patientes contrôles et SOPK normo-ovulante. La LH n'a pas d'effet sur l'expression du récepteur de l'AMH de femmes SOPK oligo/anovulantes (Pierre, Peigne et al. 2013).

2 Recepteurs de type I et protéines Smad

2.1 Dans le canal de Müller

***a* Récepteur de type I**

Pour déterminer le récepteur de type I intervenant dans la régression de ces canaux, la génération de souris invalidées pour les gènes *Acvr1a* (codant pour le récepteur ActR-IA ou ALK2), *Bmpr1a* (codant pour le récepteur BMPR-IA ou ALK3) et *Bmpr1b* (codant pour le récepteur BMPR-IB ou ALK6) a été réalisée. Les souris KO *Acvr1a* et *Bmpr1a* ne sont pas viables (Mishina, Suzuki et al. 1995 ; Mishina, Crombie et al. 1999 ; Gu, Reynolds et al. 1999). Ces souris présentent des défauts de mise en place du mésoderme pendant la gastrulation. Les souris KO *Bmpr1b* sont, en revanche, viables (Yi, LaPolt et al. 2001). Les souris mâles sont fertiles et présentent une régression totale des canaux de Müller. Le récepteur BMPR-IB ne semble donc pas impliqué dans ce processus. Pour l'étude des deux autres récepteurs de type I potentiels, il a été nécessaire de réaliser les KO conditionnels avec le système cre-loxP. La première lignée murine *Amhr2-cre*^{+/-} exprime la recombinaise cre sous le promoteur *Amhr2*. Une seconde lignée de souris a été générée, présentant les gènes cibles *Acvr1a* et *Bmpr1a* entourés de séquences dites loxP. Ces sites LoxP sont les sites de clivages spécifiques de la recombinaise cre. Les allèles portant ces séquences loxP sont dits « floxés » (fx). Les deux lignées précédentes ont été croisées pour obtenir des souris *Amhr2-cre/Avcr1a*^{fx/-} ou *Amhr2-cre/Bmpr1a*^{fx/-}. Chez ces souris, la recombinaise cre va s'activer et

cliver l'allèle présentant les sites loxP uniquement dans les cellules exprimant *Amhr2*. Chez les souris *Amhr2-cre/Avcr1a^{fx/-}* ou *Amhr2-cre/Bmpr1a^{fx/-}*, les gènes *Avcr1a* et *Bmpr1a* sont invalidés dans le mésenchyme du canal de Müller où le gène *Amhr2* s'exprime. Les souris mâles *Bmpr1a* KO conditionnelles (cKO) présentent une rétention d'oviducte et d'utérus comme les souris KO *Amhr2* (Jamin, Arango et al. 2002). Ce résultat montre l'importance de BMPR-IA dans le mécanisme de régression des canaux de Müller. Une autre étude a complété ce résultat en montrant que les récepteurs ActR-IA et BMPR-IA fonctionnent de manière redondante pour induire la régression des canaux de Müller (Orvis, Jamin et al. 2008). En effet, les souris mâles cKO *Avcr1a* présentent une régression complète des canaux de Müller dans 100% des cas alors que les souris cKO *Bmpr1a* seulement dans 50% des cas. Les souris mâles double cKO *Avcr1a/Bmpr1a* présentent une rétention complète des canaux dans la totalité des cas.

b Les protéines Smad

Les souris KO pour les gènes *Smad1* et *Smad5* meurent prématurément pendant la vie embryonnaire (Tremblay, Dunn et al. 2001 ; Chang and Matzuk 2001). Comme décrit dans le paragraphe précédent, les souris KO conditionnelles pour *Smad1* et *Smad5* ont été générées. Les lignées *Smad1* et *Smad5* floxées (Huang, Tang et al. 2002 ; Umans, Vermeire et al. 2003) ont été croisées avec la lignée *Amhr2-cre*. Les souris KO pour le gène *Smad8* sont viables et fertiles (Pangas, Li et al. 2008 ; Arnold, Maretto et al. 2006). Il a été montré que les 3 R-Smad, *Smad1*, *Smad5* et *Smad8*, fonctionnent de manière redondante pour induire la régression des canaux de Müller (Orvis, Jamin et al. 2008). En effet, seules les souris mâles cKO simultanément pour les trois Smad présentent une rétention complète des canaux de Müller. Cependant, les souris cKO *Smad5* ou les doubles cKO impliquant la *Smad5* présentent des rétentions partielles. Il semblerait donc que la *Smad5* ait un rôle plus important pour la transduction du signal de l'AMH dans les canaux de Müller.

2.2 Dans le testicule

a Récepteurs de type I

La lignée de cellules de Sertoli immatures SMAT-1 exprime tous les récepteurs nécessaires à l'induction du signal de l'AMH. Les récepteurs de type I, ActR-IA (ALK2) et BMPR-IA (ALK3) sont exprimés de façon plus importante que BMPR-IB (ALK6).

Cette lignée a été transfectée à l'aide du rapporteur Gal4-luc mais également par des formes kinases déficientes de chacun des récepteurs de type I. Ces récepteurs kinases déficients exercent un effet dominant-négatif sur les récepteurs endogènes. Seule la forme kinase déficiente de BMPR-IA abolit l'expression du gène rapporteur en réponse à l'AMH. Dans ce contexte cellulaire, le récepteur BMPR-IA est le récepteur majoritairement utilisé par l'AMH. Cependant, le récepteur ActR-IA est capable de compenser l'absence du récepteur BMPR-IA et d'activer le gène rapporteur. Son expression augmente pour compenser la perte de BMPR-IA (Belville, Jamin et al. 2005).

Des souris *Cyp17^{cre+/-}* ont été croisées avec des souris *Bmpr1a^{fx/fx}* pour obtenir des souris cKO ou le gène *Bmpr1a* a été invalidé spécifiquement dans les cellules de Leydig. La délétion de *Bmpr1a* dans les cellules de Leydig altère la synthèse des androgènes ainsi que la maturation et la différenciation de ces cellules (Wu, Zhang et al. 2012). Les auteurs ayant observé des cellules de Leydig phénotypiquement comparables chez les souris KO pour l'*Amh* (Wu, Arumugam et al. 2005), ils en conclurent que l'AMH utilisait majoritairement le récepteur BMPR-IA dans les cellules de Leydig.

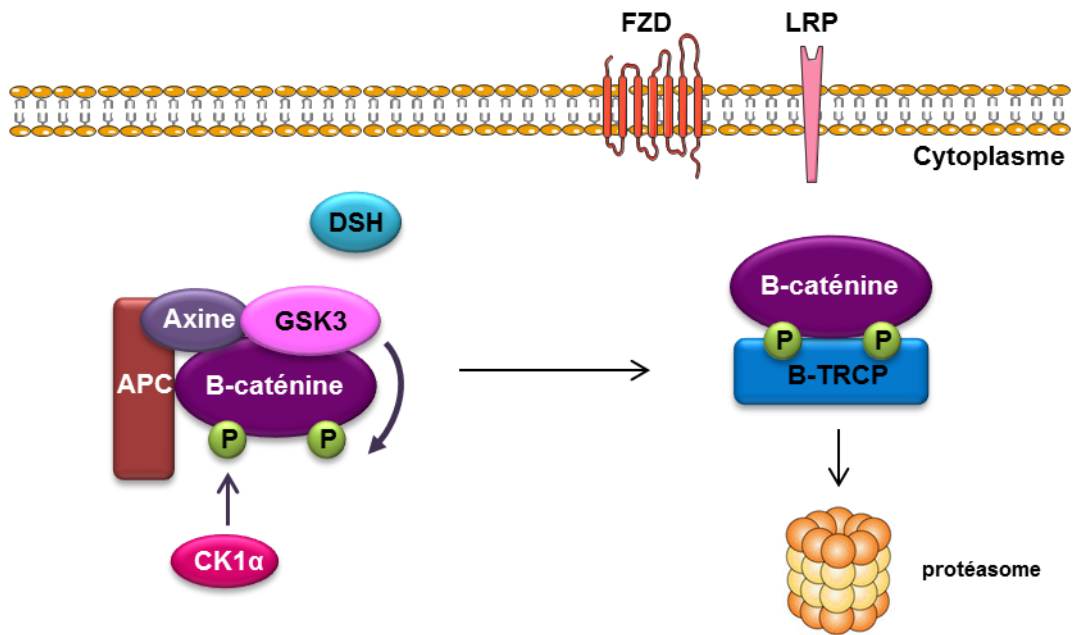
b Les protéines Smad

L'étude des protéines Smad intervenant dans les cellules de Sertoli a été réalisée sur la lignée SMAT-1. L'AMH (3.6 nM) induit la phosphorylation de la voie Smad1/5/8, le recrutement de la protéine Smad4 ainsi que l'expression de l'I-Smad, Smad6 (Belville, Jamin et al. 2005). Cependant, il n'a pas été déterminé laquelle des Smad 1, 5 ou 8 est fonctionnelle dans ce système.

2.3 Dans l'ovaire

Bien que le récepteur de type II de l'AMH soit présent dans l'ovaire et que certains des rôles physiologiques de cette hormone aient été décrits, les acteurs précis de la voie de signalisation de l'AMH ne sont pas connus. Une étude a montré que le récepteur BMPR-IB (ALK6) est l'unique récepteur de type I de l'AMH dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) (Gouédard, Chen et al. 2000). En effet, les cellules CHO ont été transfectées par des plasmides codant pour chacun des récepteurs de type I et seul BMPR-IB co-immunoprécipite avec AMHR-II. L'étude complète des acteurs de la voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa ovarienne fait l'objet de la première partie de ma thèse. Elle est présentée dans la partie résultats de ce manuscrit (page 169).

A



B

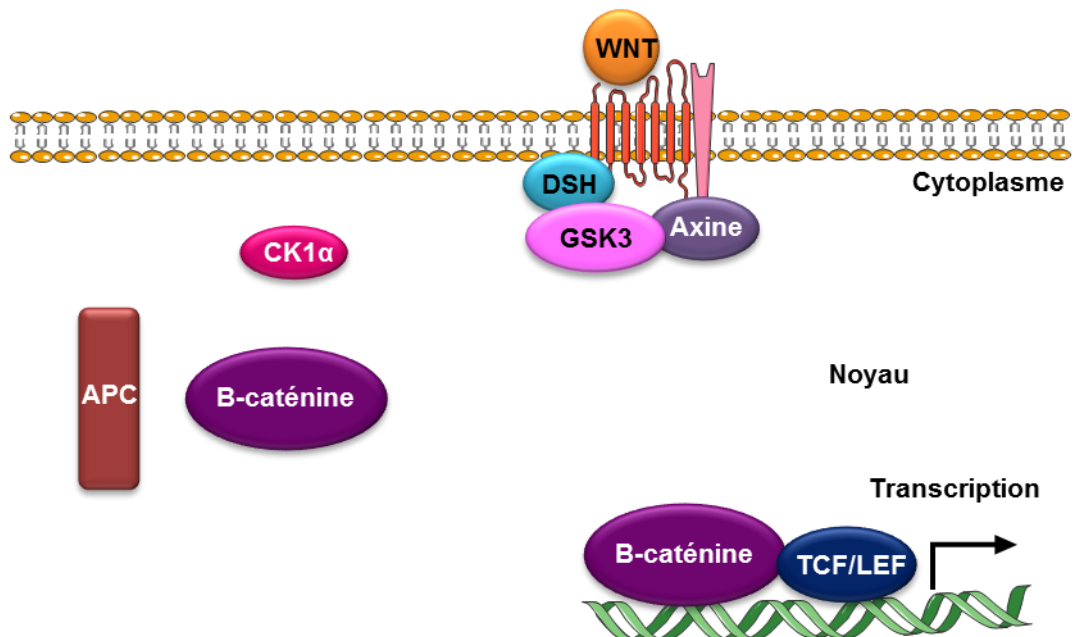


Figure 26 : Voie de signalisation canonique des WNT. (A) En l'absence de stimulation des récepteurs Frizzled (FZD) et LRP par un ligand WNT, la β -caténine est phosphorylée par les kinases GSK3 et CK1 α au sein d'un complexe de destruction comprenant également les protéines Axine et APC. Une fois phosphorylée, elle est reconnue par une ubiquitine ligase TRCP et conduite vers le protéasome. (B) En présence d'un ligand, le complexe de destruction est dissocié. La protéine DSH est recrutée à la membrane et permet l'inactivation de la kinase GSK3. La β -caténine non phosphorylée peut entrer dans le noyau et s'associer à des facteurs TCF/LEF et réguler ses gènes cibles (Kikuchi, Yamamoto et al. 2011).

2.4 Dans les autres organes

Une étude a montré que le récepteur de l'AMH était présent sur les motoneurones. Dans ces cellules, l'AMH transduit son signal par l'intermédiaire du récepteur de type I BMPR-IB et de la Smad5 (Lebeurrier, Launay et al. 2008).

X Voies de signalisation alternatives de l'AMH

1.1 La voie des Wnt

a La voie canonique WNT/ β -caténine

La voie canonique des WNTs induit une accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau. La β -caténine agit comme un coactivateur des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF. En absence de stimulation par des protéines WNTs, le pool majoritaire de β -caténine est maintenu inactif par un complexe de destruction. Ce complexe est composé des protéines APC (adenomatosis polyposis coli) et Axin qui sont des protéines d'ancrage et des kinase GSK3 (glycogen synthase kinase 3) et CK1 α (casein kinase 1 α). GSK3 et CK1 α sont constitutivement active et phosphorylent la β -caténine qui sera reconue par l'ubiquitine ligase E3 (β TrCP). La β -caténine va ensuite être dégradée par le protéasome (figure 26).

Les protéines WNTs vont se lier sur leur récepteur Frizzled et leurs corécepteurs LRP-5/6. Cette liaison induit le recrutement à la membrane et l'inactivation des protéines du complexe de destruction. Une protéine cytoplasmique DSH (Dishevelled) est également recrutée à la membrane et son rôle est d'inactiver la kinase GSK3. La forme non phosphorylée de la β -caténine transloque dans le noyau. En tant que facteur de transcription, cette protéine peut réguler les gènes cibles des protéines WNT (Clevers and Nusse 2012).

b Rôles de la voie WNT/ β -caténine dans la fonction reproductrice

La voie des protéines WNT intervient dans de nombreux processus mais plus particulièrement au moment de l'embryogénèse. Certaines protéines de cette famille sont connues pour leurs rôles dans la formation, la régression ou encore la différenciation des canaux de Müller.

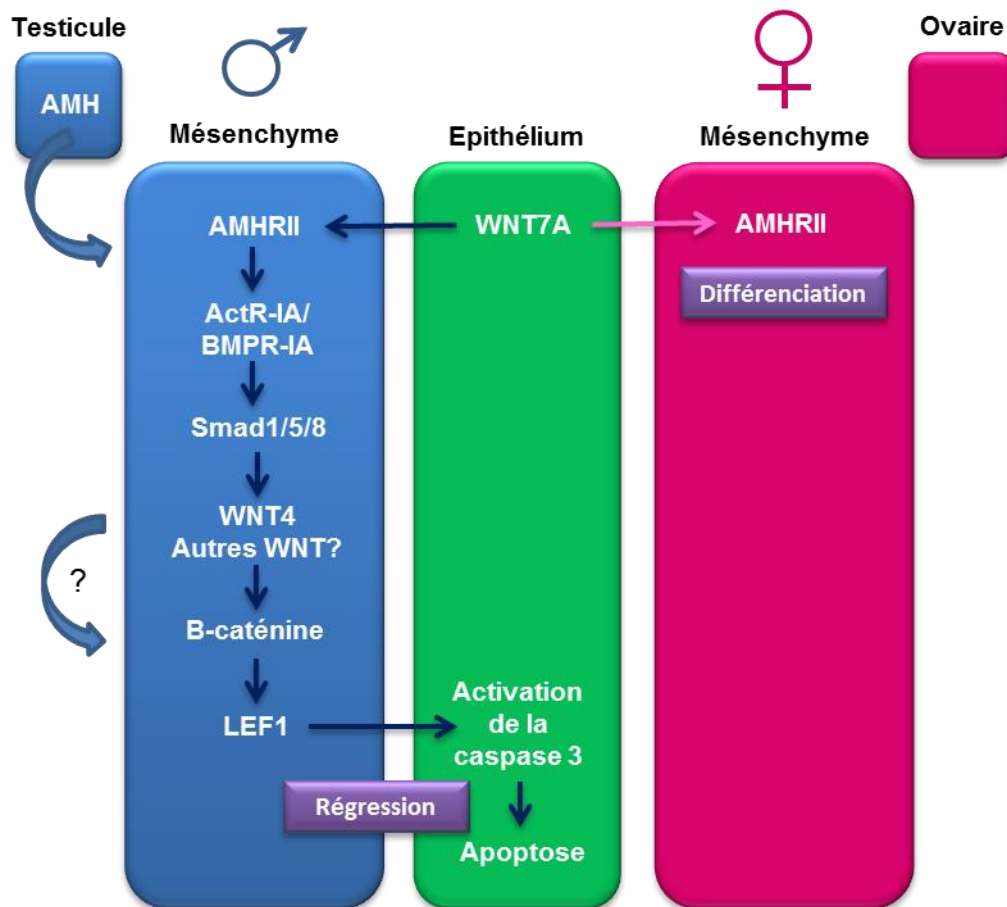


Figure 27 : Modèle de régression des canaux de Müller au cours de la différenciation sexuelle mâle. L'expression de WNT7a dans l'épithélium des canaux de Müller est essentielle à l'expression du récepteur de l'AMH dans le mésenchyme. Le fœtus mâle sécrète de l'AMH qui va se fixer sur son récepteur, AMHRII, au niveau du mésenchyme des canaux de Müller. AMHRII recrute les récepteurs de type I ActR-IA et BMPR-IA et les phosphorylent. Les Smad1/5/8 intracellulaires vont à leur tour être recrutées et phosphorylées par les récepteurs de type I. Les Smad1/5/8 vont ensuite activer directement ou indirectement l'expression de WNT4 dans les canaux de Müller du fœtus mâle. WNT4 permet la stabilisation de la beta-caténine dans le mésenchyme du canal de Müller. Il est également possible que d'autres protéines WNT interviennent dans ce processus. La beta-caténine s'associe avec les facteurs de transcription de la famille LEF pour réguler ses gènes cibles. Le signal émis par le mésenchyme pour induire l'activation de l'apoptose dans l'épithélium est inconnu. Chez la femelle, l'absence de production foetale d'AMH permet aux canaux de Müller de se différencier (Kobayashi, Stewart et al. 2011).

La protéine WNT4 a été décrite comme intervenant dans la formation des canaux de Müller et apparaît comme ayant un rôle majeur dans le maintien de ces canaux de Müller chez la femelle (Vainio, Heikkila et al. 1999). Les souris KO pour *Wnt4* meurent peu de temps après la naissance. L'étude de ces souris KO à 18.5 jpc a montré que les souris femelles KO pour le gène *Wnt4* ne présentent pas de canaux de Müller (Vainio, Heikkila et al. 1999). Pour pouvoir étudier l'effet de l'absence de WNT4 sur l'ovaire adulte, des souris KO conditionnelles ont été générées. Chez les souris *Amhr2-cre/Wnt4^{flx/-}* l'expression de *Wnt4* est abolie uniquement dans les cellules de la granulosa (Boyer, Lapointe et al. 2010). Ces souris sont hypofertiles et présentent de petits ovaires. A 42 jours post-partum, les souris ne présentent que peu de follicules antraux en bonne santé, ce qui est potentiellement dû à une augmentation de l'atrésie folliculaire. Ces résultats montrent que la protéine WNT4 est importante pour une fonction reproductrice normale chez la femelle et joue un rôle sur la survie des follicules antraux en croissance.

La protéine WNT7a est essentielle pour la régression de ces canaux ainsi que pour leur différenciation. WNT7a est exprimée dans l'épithélium du canal de Müller et les souris mâles mutantes pour cette protéine présentent une rétention des canaux de Müller (Parr, Cornish et al. 2001). Les souris femelles présentent une différenciation anormale du mésenchyme et une absence d'utérus (Miller and Sassoon 1998).

Des études montrent que la voie de la β -caténine serait essentielle pour la régression des canaux de Müller. En effet, la β -caténine s'accumule dans le mésenchyme du canal de Müller (Allard, Adin et al. 2000). La génération de souris KO conditionnelles pour *Wnt4* ou *Ctnnb1* (gène codant pour la β -caténine) dans le mésenchyme du canal de Müller a permis de mettre en évidence le rôle essentiel de ces deux protéines pour la régression (Kobayashi, Stewart et al. 2011). L'équipe de Richard Behringer propose un modèle pour la régression des canaux de Müller. L'AMH produite par les cellules de Sertoli activerait via ActR-IA/BMPR-IA les Smad1/5/8. Une fois activées, les Smads induiraient l'expression de *Wnt4* (et potentiellement d'autres *Wnt*). WNT4 permettrait d'activer la β -caténine induisant la régression des canaux de Müller (Kobayashi, Stewart et al. 2011) (figure 27).

Une étude a montré que la suractivation de la β -caténine pouvait causer des tumeurs testiculaires. En effet, des souris mutantes dont la β -caténine a été activée constitutivement dans les cellules de Sertoli présentent des tumeurs sertolienne à 8 mois (Chang, Guillou et al. 2009).

Chez les souris surexprimant la β -caténine, l'AMH produite par les cellules de Sertoli est capable d'inhiber la tumorigénèse. L'équipe de José Teixeira a utilisé un modèle de souris surexprimant la β -caténine et dont le gène codant pour le récepteur de l'AMH a été invalidé. Ces souris présentent une tumeur des cellules de Sertoli et de Leydig quelques semaines après la naissance avec une prévalence de 100% (Tanwar, Commandeur et al. 2012).

Une étude a montré en 2005 que dans la lignée de cellules de Sertoli SMAT-1 transfectée avec un rapporteur de la voie β -caténine, l'AMH n'avait pas d'effet sur l'expression de ce rapporteur (Belville, Jamin et al. 2005). L'AMH ne semble pas modifier la voie β -caténine dans les cellules de Sertoli. L'étude du rôle de l'AMH sur cette voie dans les cellules de la granulosa est traitée dans la partie résultats de ce manuscrit (page 175).

La dérégulation de la voie de la β -caténine peut également être la cause de cancer des cellules de la granulosa. En effet, des cellules de la granulosa tumorales humaines et équine présentent une augmentation de la forme active de la β -caténine dans le noyau. De plus, des souris exprimant une forme constitutivement active de la β -caténine présentent des tumeurs de la granulosa à partir de 6 semaines (Boerboom, Paquet et al. 2005). Toutes ces données montrent que la dérégulation de la voie WNT/ β -caténine est une cause majeure de cancers gonadiques. L'AMH participerait à l'inhibition de la tumorigénèse en inhibant cette voie.

Cyp19a1 (codant pour l'aromatase), est un gène dont l'expression est régulée par la FSH dans les cellules de la granulosa. Une étude a mis en évidence que la β -caténine augmentait l'expression de *Cyp19a1* induite par la FSH. De ce fait, la β -caténine aurait un rôle sur la production des oestrogènes et la maturation folliculaire (Parakh, Hernandez et al. 2006).

1.2 La voie NF- κ B

a Voie canonique NF- κ B

NF- κ B est une protéine qui fait partie de la superfamille des facteurs de transcription. Elle est impliquée dans la réponse immunitaire, la réponse au stress, et c'est également un facteur anti-apoptotique.

NF- κ B est une protéine cytoplasmique composée de deux sous-unités : p50 et p65 (RelA). Elle est maintenue inactive par la liaison à la protéine I κ B.

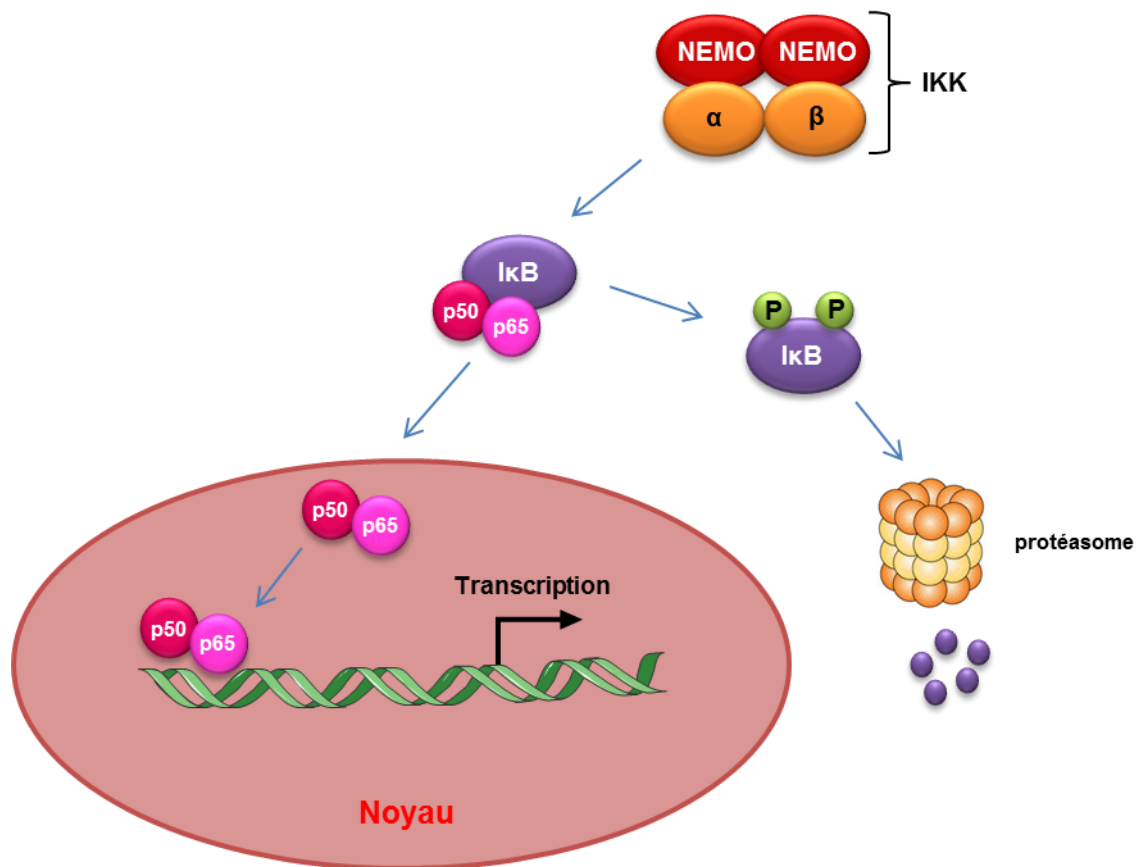


Figure 28 : Voie de signalisation canonique NFκB. NF-κB est une protéine cytoplasmique composée de deux sous-unités : p50 et p65 (aussi appelée RelA). Elle est maintenue inactive par la liaison à la protéine IκB. La kinase IKK va phosphoryler la protéine IκB en réponse à certains signaux extracellulaires. NFκB est libéré et transloque dans le noyau pour réguler ses gènes cibles (Gilmore 2006).

La kinase IKK phosphoryle I κ B en réponse à des signaux extracellulaires ce qui permet la libération de NF- κ B. Une fois libre NF- κ B transloque dans le noyau ce qui permet la régulation de gènes cibles (Gilmore 2006) (figure 28). Cette voie peut être activée par de nombreux signaux et l'AMH en fait partie.

b Activation de la voie NF- κ B par l'AMH

Le récepteur de l'AMH, AMHR-II, est exprimé dans la glande mammaire ainsi que dans les deux lignées cancéreuses ER-positive T47D et ER-négative MDA-MB-231 (Segev, Ha et al. 2000). L'AMH inhibe la croissance de ces deux lignées via l'activation de la voie NF- κ B et la surexpression du gène cible de cette voie *I κ B*. Il a également été montré par la même équipe qu'une administration d'AMH chez la souris induisait l'activation de la voie NF- κ B et l'expression du gène *I κ B* dans la glande mammaire (Segev, Hoshiya et al. 2001).

De plus, l'exposition à de l'AMH in vivo augmente l'apoptose des cellules épithéliales mammaires. L'ensemble des résultats de ces deux études montre l'importance de l'AMH dans la régulation de la voie NF- κ B et dans la croissance des cellules du sein.

La même équipe s'est intéressée au rôle de l'AMH sur la voie NF- κ B dans la prostate. Le récepteur de l'AMH est exprimé dans la prostate normale et dans des lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate. De plus, l'administration d'AMH chez la souris mâle induit l'augmentation de l'expression du gène *I κ B* dans la prostate. Ceci suggère que l'AMH pourrait être un régulateur hormonal endogène de la voie NF- κ B dans la prostate in vivo et in vitro (Segev, Hoshiya et al. 2002).

Dans la lignée de cellules de Sertoli SMAT-1 transfectée avec un rapporteur de la voie NF- κ B, la stimulation avec de l'AMH n'a pas d'effet sur l'expression de ce rapporteur (Belville, Jamin et al. 2005). Il semblerait que l'AMH n'ait pas d'effet sur la voie NF- κ B dans les cellules de Sertoli. L'effet de l'AMH sur cette voie dans les cellules de la granulosa est traité dans la partie résultats de ce manuscrit (page 175).

En 2007, une étude a mis en évidence la collaboration entre les voies NF- κ B et Smad1 pour activer un gène anti-prolifératif dans les cellules cancéreuses du sein, le gène *GRO- β* (Gupta, Yeo et al. 2007).

XI Objectifs de ce travail

L'AMH a été décrite dans les années 50 et depuis, de nombreuses études se sont attachées à comprendre les rôles de cette hormone dans la fonction reproductrice. Du fait de son action sur la régression des canaux de Müller, l'AMH a éveillé l'intérêt des chercheurs qui ont dans un premier temps étudié les rôles de cette hormone chez le mâle. Dans les années 2000, l'étude poussée des souris KO pour l'*Amh* a permis de montrer que cette hormone présentait également une fonction importante sur la régulation de la folliculogenèse chez la femelle.

L'AMH s'exprime dans les cellules de la granulosa ovarienne et c'est actuellement un marqueur très utilisé pour évaluer la réserve folliculaire ou encore diagnostiquer des cancers. Malgré l'intérêt croissant pour cette hormone chez la femelle, son mécanisme d'action précis n'a pas été décrit.

La (ou les) voie(s) de signalisation de l'AMH reste(nt) encore inconnue(s) dans l'ovaire. Ceci constitue le premier volet de mon travail de recherche. Actuellement, on connaît la voie canonique de l'AMH, à savoir qu'elle utilise un récepteur de type II qui lui est spécifique, AMHR-II, et un récepteur de type I qui peut être ActR-IA, BMPR-IA ou BMPR-IB. Une fois les récepteurs activés, les Smad1/5/8 intracellulaires sont phosphorylées pour permettre la transmission du signal. Or le récepteur de type I et la protéine Smad prioritairement recrutés par l'AMH dans les cellules de la granulosa sont actuellement inconnus. Pour déterminer les acteurs de la voie de signalisation de l'AMH dans l'ovaire, nous avons éteint l'expression de ces acteurs et analysé la réponse à l'AMH de cellules de la granulosa en culture primaire. L'utilisation de siRNA dirigés contre chacun des récepteurs de type I a permis de montrer que BMPR-IA semblait être le récepteur de type I recruté par l'AMH dans les cellules de la granulosa. J'ai pu confirmer ce résultat par l'analyse des cellules de la granulosa isolées à partir de souris cKO pour *Acvr1* (codant pour ActR-IA) ou *Bmpr1a*. En effet, les cellules de la granulosa isolées à partir de souris cKO *Bmpr1a* ne sont plus capables de répondre à une exposition à l'AMH par la phosphorylation des Smads intracellulaires. J'ai également étudié l'importance du co-récepteur aux BMPs, Rgmb, dans la voie de signalisation de l'AMH. L'invalidation transitoire de *Rgmb* par la transfection de siRNA, m'a permis de montrer que ce co-récepteur n'est pas nécessaire à la transduction du signal de l'AMH dans les cellules de

la granulosa. La technique de gènes rapporteurs Smad/gal4-UAS/luciférase m'a permis d'identifier les Smads nécessaires à la transduction du signal de l'AMH dans les cellules de la granulosa murines en culture primaire. Seules les Smad1 et 5 sont recrutées et phosphorylées en réponse à une exposition des cellules de la granulosa à l'AMH.

La recherche de nouveaux gènes cibles dans l'ovaire est une étape essentielle pour la compréhension du rôle physiologique de l'AMH dans l'ovaire. Cet aspect représente le second volet de mon travail de thèse. Nous avons choisi d'utiliser une approche globale basée sur les puces Affymetrix MoGene 2.0 ST. Nous avons comparé les transcriptomes d'ovaires entiers isolés à partir de souris WT ou KO pour l'*Amh* dans un premier temps. Ces résultats ont ensuite été complétés par ceux obtenus à partir de cellules de la granulosa exposées ou non avec de l'AMH pendant 6h ou 24h. Cette technique a permis d'identifier de potentiels nouveaux gènes cibles de cette hormone dans l'ovaire tels que *Kcnj2* ou *Ovgp1*.

Le récepteur spécifique de l'AMH, AMHR-II, est exprimé par les cellules du myomètre utérin. Dans cet organe, les fonctions de l'AMH n'ont pas encore été explorées. Le dernier volet de mon travail vise à déterminer dans un premier temps l'expression de l'*Amh* dans l'utérus murin puis d'établir les rôles potentiels de cette hormone. J'ai pu mettre en évidence une expression du gène de l'*Amh* dans l'utérus et les analyses protéiques sont en cours. J'ai réalisé une expérience de macro-array (PCR-array) pour comparer l'expression de 84 gènes relatifs aux voies de signalisations des BMPs et du TGF- β entre des échantillons d'utéri WT et KO pour l'*Amh*. Cette expérience a permis d'identifier de nombreux gènes dérégulés dans l'utérus KO *Amh* laissant supposer que cette hormone joue un rôle dans la régulation de la fonction utérine.

A l'heure actuelle, la recherche sur l'AMH connaît un essor en clinique mais ses rôles et son mécanisme d'action sont encore mal connus chez la femme. L'ensemble de ce projet avait pour principal but de mieux comprendre la fonction physiologique de l'AMH dans le tractus génital femelle. L'AMH joue un rôle important dans la régulation de la fonction reproductrice et il est essentiel d'approfondir les connaissances sur cette hormone pour permettre, à terme, d'appréhender les causes de certaines pathologies.

Matériels et Méthodes

Croisement

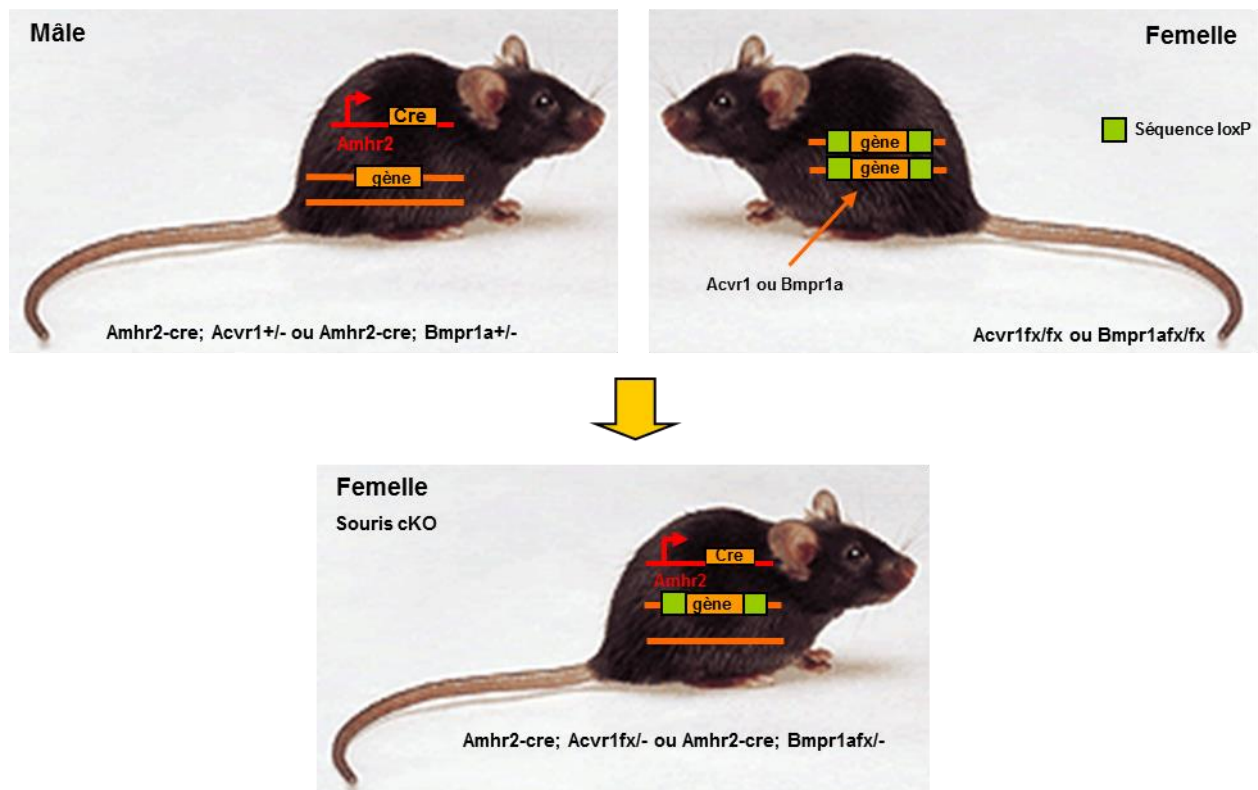


Figure 29 : génération des souris cKO *Acvr1* et *Bmpr1a*. Nous disposons de 5 lignées de souris génétiquement modifiées au laboratoire. La lignée *Amhr2-cre*, la lignée *Acvr1^{+/-}*, la lignée *Bmpr1a^{+/-}*, la lignée *Acvr1^{fx/fx}* et la lignée *Bmpr1a^{fx/fx}*. Les lignées *Acvr1^{fx/fx}* et *Bmpr1a^{fx/fx}* présentent une partie des gènes *Acvr1* et *Bmpr1a* flanquée de séquences loxP qui sont les séquences cibles de la recombinaison cre. En présence de cette recombinaison, la partie du gène entourée par les séquences loxP va être excisée rendant la transcription impossible ou ne permettant qu'une traduction partielle. Les souris *Amhr2-cre* présente le gène codant pour la recombinaison cre placé sous le promoteur de l'*Amhr2*. Ces souris expriment donc la recombinaison cre uniquement dans les cellules exprimant *Amhr2*. Des mâles *Amhr2-cre* vont être croisés avec des femelles *Acvr1^{+/-}* ou *Bmpr1a^{+/-}* pour obtenir des mâles *Amhr2-cre; Acvr1^{+/-}* ou *Amhr2-cre; Bmpr1a^{+/-}*. Ces mâles vont dans un second temps être croisés avec des femelles *Acvr1^{fx/fx}* ou *Bmpr1a^{fx/fx}* pour obtenir des souris femelles *Amhr2-cre; Acvr1^{fx/-}* (*Acvr1* cKO) ou *Amhr2-cre; Bmpr1a^{fx/-}* (*Bmpr1a* cKO). Ces femelles ne présentent qu'une copie du gène cible et cette copie va être clivée par la recombinaison cre dans les cellules exprimant *Amhr2*. Les cellules cibles de mon projet sont les cellules de la granulosa ovarienne qui expriment *Amhr2*. Chez les souris *Acvr1* cKO et *Bmpr1a* cKO, les cellules de la granulosa ne sont plus capables de produire les récepteurs ActR-IA (*Acvr1*) et BMPR-IA.

I Réactifs

L'hormone anti-Müllerienne (AMH) est produite à partir de milieu de culture de cellules CHO (Chinese hamster ovary) transfectées de façon stable avec un cDNA codant pour l'AMH humaine (di Clemente, Jamin et al. 2010). L'AMH est purifiée et clivée par la plasmine. Elle est utilisée sur les cellules de la granulosa à une concentration de 8 nM ou de 40 nM. La protéine BMP2, fournie par le Professeur Walter Sebald (Université de Würzburg, Allemagne) est utilisée à la concentration de 10 nM. La protéine TGF- β (R&D Systems, France) est utilisée à une concentration de 1 nM.

II Modèles

1 Souris

Pour la préparation des cellules primaires de la granulosa, des souris femelles immatures C57BL/6JRj de 3 semaines ont été achetées à l'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France).

Les lignées de souris *Amhr2-cre* (Jamin, Arango et al. 2002), *Acvr1*^{+/-} (Mishina, Crombie et al. 1999), *Bmpr1a*^{+/-} (Mishina, Suzuki et al. 1995), *Acvr1*^{fx/fx} (Dudas, Sridurongrit et al. 2004), *Bmpr1a*^{fx/fx} (Mishina, Hanks et al. 2002) sont maintenues sur un fond génétique mixte C57BL/6J; 129/SvEv. Les males *Amhr2-cre*; *Acvr1*^{+/-} ou *Amhr2-cre*; *Bmpr1a*^{+/-} sont croisés avec des femelles *Acvr1*^{fx/fx} or *Bmpr1a*^{fx/fx} pour générer des femelles mutantes conditionnelles pour *Acvr1* (*Acvr1* cKO) ou *Bmpr1a* (*Bmpr1a* cKO) respectivement (figure 29). Les femelles *Acvr1* cKO et *Bmpr1a* cKO sont utilisées pour la préparation de cultures primaires de cellules de la granulosa.

La lignée de souris invalidée pour le gène de l'*Amh* (*Amh* KO) est également maintenue sur un fond génétique mixte C57BL/6J; 129/SvEv. Cette lignée a été utilisée pour rechercher de nouveaux gènes cibles de l'AMH par macro-array ou par criblage haut débit sur puces à ADN.

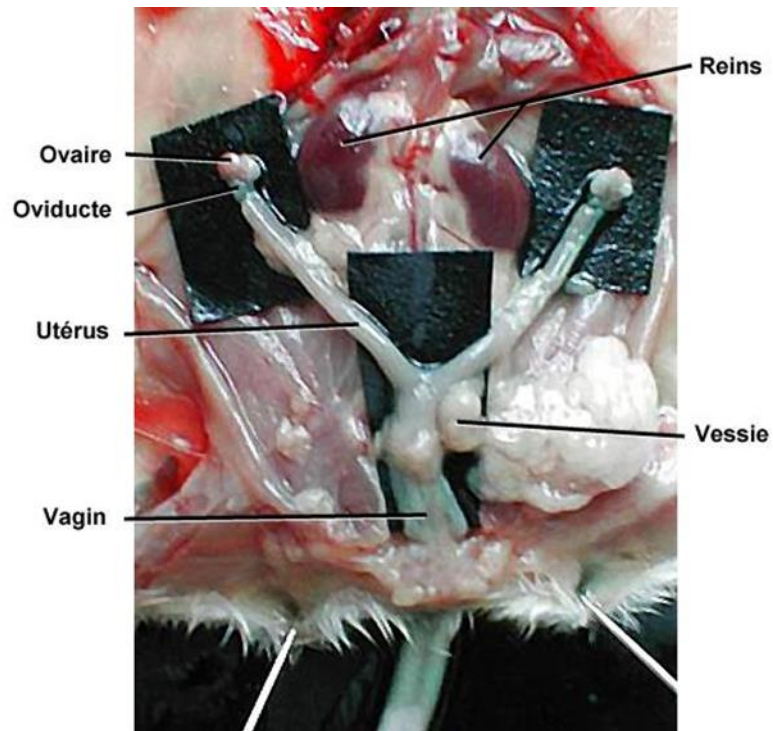


Figure 30 : L'appareil reproducteur femelle. Après euthanasie, les souris sont ouvertes et les ovaires ainsi que les utéri sont récupérés. L'utérus de souris est composé de deux cornes au bout desquelles on trouve les oviductes suivis des ovaires. Les ovaires ont été récupérés chez des souris sauvages ainsi que des souris cKO *Acvr1* et cKO *Bmpr1a* pour réaliser des cultures primaires de cellules de la granulosa. Les ovaires et utéri de souris KO *Amh* ont été récupérés pour une analyse de transcriptome.

1.1 Euthanasie

Les souris utilisées ont toujours été euthanasiées par endormissement au CO₂ qui est une méthode validée par les comités d'éthique.

1.2 Dissection

Une fois morts, les animaux sont placés sur le dos, ouverts et les ovaires ainsi que l'utérus sont récupérés (figure 30).

1.3 Génotypage

L'ADN génomique est extrait à partir de biopsies de queues de souris en utilisant le kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Les amorces utilisées sont listés dans le tableau 7. La PCR se déroule en plusieurs étapes. Une première phase d'activation de l'enzyme se fait à 95°C pendant 5 min. Cette étape est suivie de 35 cycles d'amplification. Chaque cycle comprend une phase à 95°C pendant 45 s, une phase à 58°C pendant 45 s et une phase à 72°C pendant 45 s. La dernière étape permet une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 2% contenant 0.5 mg/ml de Bromure d'éthidium (BET) ou de Gel Red (Invitrogen). La migration se fait dans du tampon TAE 1X à 100V pendant 40 min. Les produits de PCR sont visualisés sous rayonnement UV à 254 nm.

Allele	primers	sequences (5'-3')	amplicon	note
Cre	mAmhr2 E5-R PTMWbpA-F	GAA-ACG-CAG-CTC-GGC-CAG-C CGC-ATT-GCT-TGA-GTA-GGT-GT	cre:300 pb	
Alk2+/-	mAlk2-F mAlk2-R PGK	ATG-CTA-GAC-CTG-GGC-AGC-CAT-A CAT-GCT-AGC-AGC-TCG-GAG-AAA-C GAC-ACT-AGT-GAG-ACG-TGC-TAC-T	allele +: 373 pb allele -: 337 pb	
Alk2fx	mAlk2fx-F mAlk2-R	CCC-CCA-TTG-AAG-GTT-TAG-AGA-GAC CTA-AGA-GCC-ATG-ACA-GAG-GTT-G	allele +: 250 pb allele fx: 160+90 pb	BglI digestion
Alk3+/-	mAlk3fx3 mAlk3fx5	AGA-CTG-CCT-TGG-GAA-AAG-CGC GGA-CTA-TGG-ACA-CAC-AAT-GGC	allele -: 190 pb	
Alk3fx	mAlk3fx2 mAlk3fx4	GCA-GCT-GCT-GCT-GCA-GCC-TCC TGG-CTA-CAA-TTT-GTC-TCA-TGC	allele +: 150 pb allele fx: 230 pb	
Amh (allèle wt)	mAmhWT-F mAmhWT-R	GGA-ACA-CAA-GCA-GAG-CTT-CC GAG-ACA-GAG-TCC-ATC-ACG-TAC-C	243 pb	
Amh (allèle ko)	mAmhKO-F mAmhKO-R	CTT-GGG-TGG-AGA-GGC-TAT-TC AGG-TGA-GAT-GAC-AGG-AGA-TC	280 pb	

Tableau 7 : Amorces utilisées pour le génotypage des souris mutantes

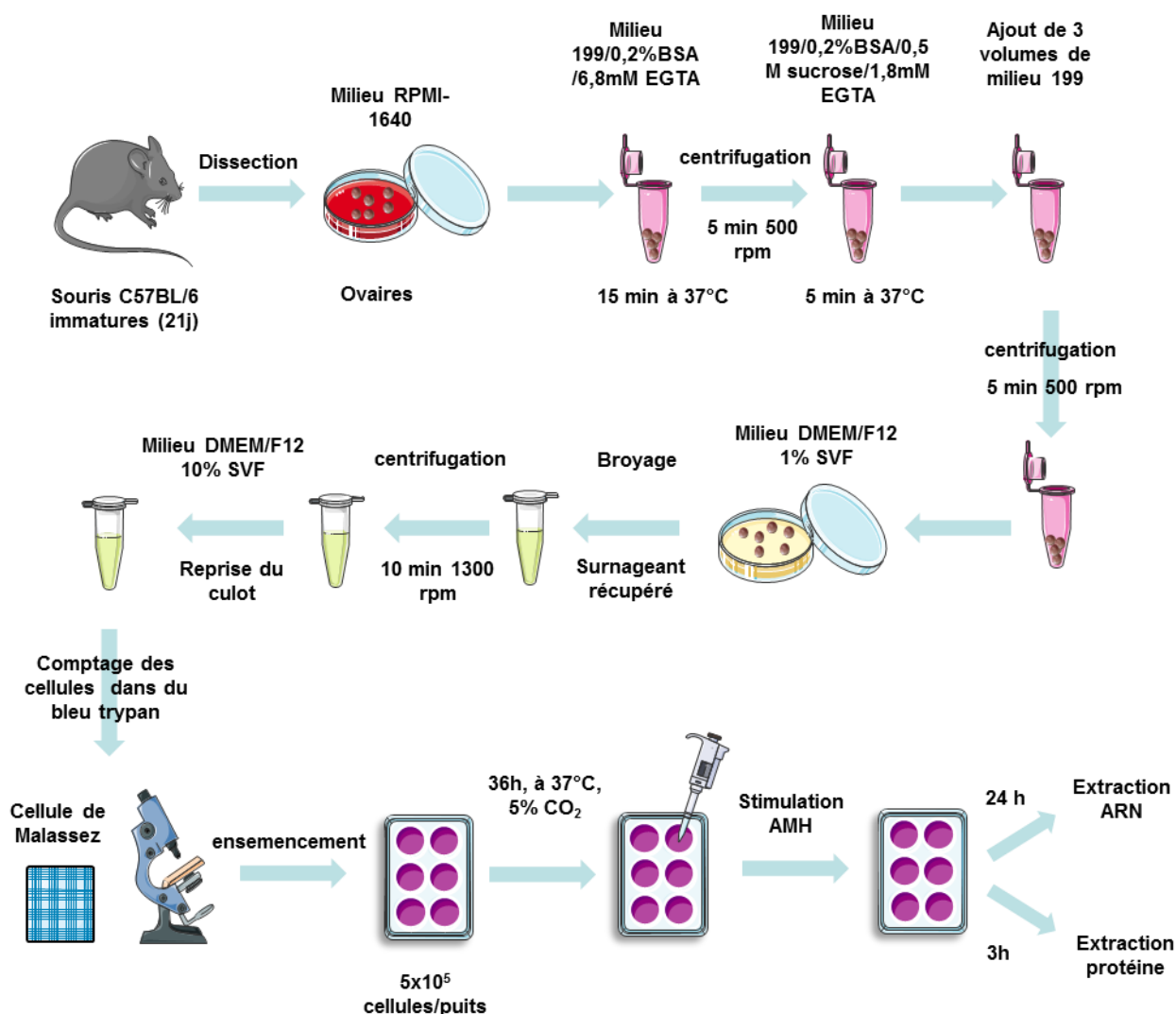


Figure 31 : Culture primaire de cellules de la granulosa murine. Les cellules de la granulosa sont préparées à partir d'ovaires de souris immatures de 3 semaines. Ce protocole a été adapté à partir d'une publication de Campbell (Campbell 1979). Les ovaires sont prélevés et placés dans différents milieux permettant la dissociation des cellules. Les ovaires sont ensuite écrasés à l'aide d'une spatule ce qui permet la libération des cellules de la granulosa. Ces cellules vont ensuite être comptées puis ensemencées dans des plaques 6 puits ou des Labteck 4 puits. Les souris à 3 semaines sont immatures et donc non cyclées. L'ovaire ne présente donc pas de corps jaunes ni de follicules trop développés ce qui limite les contaminations par les cellules de la thèque.

2 Cellules de la granulosa murine

2.1 Culture primaire

L'isolement des cellules de la granulosa se fait selon une adaptation du protocole de Campbell (Campbell 1979). Pour obtenir un nombre important de cellules, les cultures ont le plus souvent été faites à partir de 12 souris (soit 24 ovaires) C57BL/6 immatures de trois semaines. Cependant, la culture peut être faite à partir d'une unique souris en adaptant les volumes. En effet, les cultures de cellules de la granulosa de souris *Acvr1a*, *Bmpr1b* cKO et *Amh* KO ont été faites sur des souris isolées.

Les ovaires de souris C57BL/6 âgées de trois semaines sont prélevés et mis en attente dans du milieu RPMI-1640 (Invitrogen) supplémenté en antibiotiques. Les ovaires sont ensuite coupés en deux et incubés 15 min à 37°C dans du milieu 199 (Invitrogen) 0,2% BSA/6.8mM EGTA. Le milieu est éliminé après une centrifugation de 5 min à 500 rpm. Les ovaires sont repris dans du milieu 199 0.2% BSA/0.5M Sucrose/1.8mM EGTA et incubés 5 min à 37°C. Ce milieu est dilué par trois volumes de milieu 199 et centrifugé 5 min à 500 rpm. Les ovaires sont ensuite repris dans du milieu DMEM/F12, avec 1% SVF et 1% d'antibiotiques puis les cellules de la granulosa sont expulsées avec une spatule. Le surnageant contenant les cellules de la granulosa, est récupéré et centrifugé 10 min à 800 g. Le culot de cellules de la granulosa est repris dans du milieu DMEM/F12, 10% SVF et 1% d'antibiotiques. Un échantillon de 50 µl est prélevé auxquels sont rajoutés 10 µl de bleu trypan (Trypan blues tain 0,4%, Gibco). Les cellules bleues sont mortes et ne sont donc pas comptées. Seules les cellules blanches et réfringentes sont comptées pour l'ensemencement qui se fait dans des plaques 6 puits à une densité de 5×10^5 cellules par puits (figure 31).

2.2 Lignée cellulaire AT29C-U493

La lignée ATC est une lignée de cellules de la granulosa immortalisées issue de tumeurs gonadiques obtenues chez des souris transgéniques surexprimant l'oncogène SV40 (Simian Virus 40) sous le contrôle du promoteur de l'*Amh* (Dutertre, Gouédard et al. 2001).

a* *Culture

Ces cellules se cultivent à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ dans un milieu DMEM (Invitrogen) contenant du GlutaMax, 2% d'acides aminés, 1% d'antibiotiques et 10% de SVF.

b* *Repiquage

Les cellules ATC ensemencées dans des flasques 75 cm² sont rincées avec du Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X puis décollées à l'aide de Trypsine EDTA (Eurobio) à 37°C pendant quelques minutes. Les cellules sont centrifugées puis reprises dans du milieu DMEM GlutaMax supplémenté en SVF, acides aminés et antibiotiques. Le repiquage se fait au 1/5.

3 Utérus murin

Les échantillons contrôles d'utéri ont été prélevés sur des souris de 8 semaines après accouplement et visualisation du bouchon vaginal. Ces utéri sont donc prélevés à 0,5 jpc. Pour suivre l'évolution de l'expression de l'AMH au cours de la gestation, des échantillons utérins ont également été prélevés à 10,5 jpc, 17,5 jpc et 19,5 jpc.

III Immunocytofluorescence

Les cellules sont ensemencées sur des LabTek® (4 puits) à une concentration de 1,5x10⁵ cellules par puits et cultivées pendant 24 à 48 h. Les cellules sont rincées dans du PBS 1X, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 min. Elles sont ensuite rincées dans du PBS 1X puis perméabilisées dans du PBS/0.1% Tween 20. Les sites non spécifiques sont bloqués dans un tampon PBS 1X, 10% BSA, 0.3% triton pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire à 4°C en atmosphère humide sur la nuit. Les anticorps primaires utilisés sont dirigés contre l'AMH (polyclonal de chèvre, Santa cruz 1/50^{ème}) ou OVGP1 (polyclonal de Lapin, abcam 1/250^{ème}). Après un rinçage au PBS/Triton, les cellules sont ensuite incubées en présence de l'anticorps secondaire (anticorps anti-chèvre ou anti-lapin conjugués à l'Alexa fluor-488) pendant 1h à température ambiante.

	Ovaire de 3 et de 8 sem	Utérus de 8 sem
Ethanol 90 %	30 min	5 h
Ethanol 100 % (1)	1 h	1 h
Ethanol 100 % (2)	1 h	1 h
Butanol (1)	15 min	2 h
Butanol (2)	1 h	5 h
Butanol (3)	15 min	4 h
Paraffine (1)	2 h	2 h
Paraffine (2)	> 2 h	> 2 h

Tableau 8 : Programmes du Citadel utilisés en fonction des échantillons à inclure

	Durée des bains
Toluène (1)	10 min
Toluène (2)	10 min
Toluène (3)	10 min
Ethanol 100 % (1)	5 min
Ethanol 100 % (2)	5 min
Ethanol 95 % (1)	2 min
Ethanol 95 % (2)	2 min
Ethanol 90 %	2 min
Ethanol 80 %	2 min
Ethanol 70 %	2 min
Ethanol 60 %	2 min
Ethanol 50 %	2 min
H2O	2 min

Tableau 9 : Programme du Varistain utilisé pour réhydrater les échantillons

Les cellules sont rincées dans du PBS puis, les lames sont montées avec le milieu Vectashield contenant du DAPI (Vector Laboratories, Abcys, France).

IV Immunohistochimie

1 Préparation des échantillons

Les ovaires et les uteri sont collectés et fixés dans du PFA 4% pendant 4h pour les ovaires et 24h pour les utéri à 4°C. Les échantillons sont rincés dans du PBS (pH 7.4) puis déhydratés pendant 24 h dans de l'éthanol 30% puis 24 h dans de l'éthanol 50% et 24 h dans de l'éthanol 70%. Les organes sont ensuite placés dans des cassettes d'inclusion et les dernières étapes sont réalisées à l'aide d'un automate de déhydratation, le Citadel (Citadel 2000, Shandon). Les étapes du Citadel se terminent par des bains de butanol suivis de bains de paraffine. Les programmes utilisés pour les différents échantillons sont présentés dans le tableau 8. Les organes sont ensuite placés en bloc de paraffine et coupés au microtome en sections fines de 5 µm. Les coupes sériées sont montées dans de l'eau albuminée sur des lames préalablement traitées au TESPA (3-aminopropyltriethoxy-silane). Les lames montées sont conservées à 4°C.

2 Marquage

Les coupes sont dans un premier temps déparaffinées dans un bain de Toluène puis réhydratées par des bains d'éthanol décroissant. Ces étapes sont réalisées par un automate, le Varistain (Varistain 24-3, Shandon). Le programme utilisé est présenté dans le tableau 9. Pour le démasquage antigénique, les sections sont placées à 95°C pendant 20 min dans du tampon citrate (Unmasking antigen Vector laboratories). Une fois les lames refroidies, elles sont ensuite rincées dans du PBS puis les sites non spécifiques sont bloqués dans du PBS/BSA pendant 1 h avant l'incubation dans l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C (RGMb antibody (Santa Cruz) (1:100 dans le tampon DAKO); OVGP1 (abcam) (1:250 dans du PBS/BSA/sérum de lapin). Les lames sont ensuite rincées dans du PBS et incubées avec un anticorps secondaire biotinylé (anti-lapin 1:500, Vector Laboratories) 1 h à température ambiante. Après un dernier lavage, les coupes sont incubées 1 h dans le réactif ABC (ABC kit, Vectastain, Abcys) et le marquage est révélé à l'aide du DAB (3-3' diaminobenzidine tétrahydrochloride, Sigma), substrat des peroxydases.

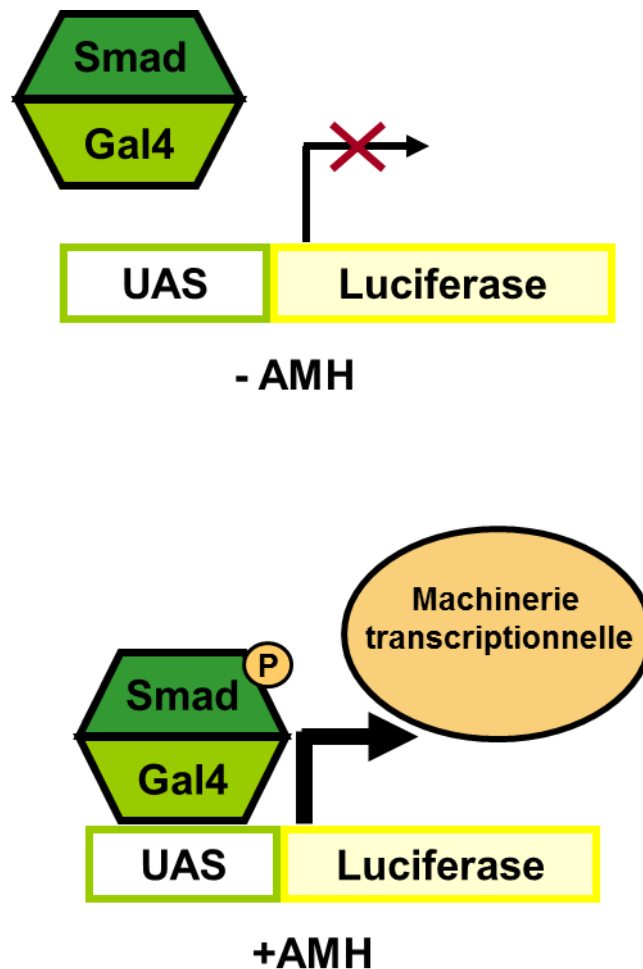


Figure 32 : Principe de la technique des gènes rapporteurs Smad-Gal4/UAS-luciférase. En absence d'AMH, la Smad de la protéine de fusion Smad-Gal4 n'est pas phosphorylée. La protéine de fusion se trouve donc en majorité dans le cytoplasme et ne peut pas recruter de façon stable la machinerie de transcription. Il n'y a qu'une expression basale de la luciférase. En présence d'AMH, la Smad va alors être phosphorylée et la protéine de fusion va être transloquée au noyau. Gal4 va pouvoir se fixer de façon stable aux séquences UAS et il va y avoir une expression plus importante de la luciférase.

Après environ 5 min de contact avec le DAB, les lames sont rincées dans du PBS. Les lames sont contre-colorées 1 min dans l'hémalun de masson suivie d'un bref rinçage et d'1 min dans une solution de carbonate de lithium (Sigma). Après déshydratation, les lames sont montées sous lamelles dans un milieu hydrophobe permanent, l'Eukitt (Kindler).

V Transfections

1 Ensemencement

36 h avant la transfection, l'ensemencement se fait dans des plaques 6 puits à une densité de 5×10^5 cellules par puits pour les cellules primaires de la granulosa, dans 2 ml de milieu de DMEM/F12 contenant du SVF et des antibiotiques afin d'obtenir une confluence cellulaire de 50% à 70% environ le jour de la transfection.

2 Transfection transitoire d'ADN plasmidique

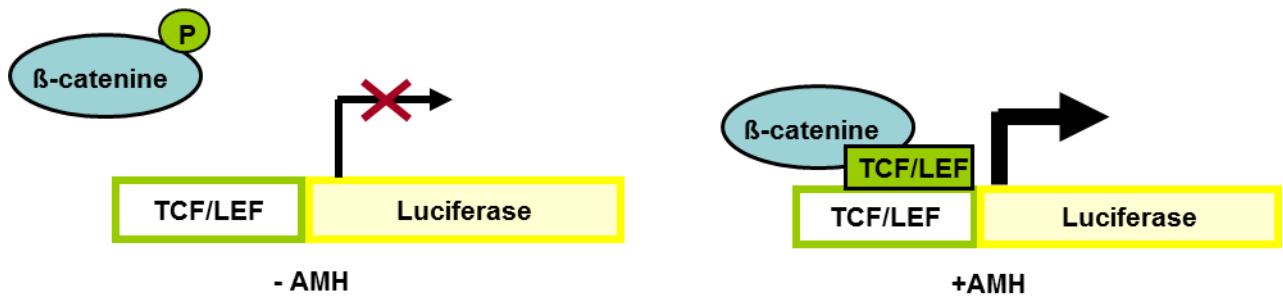
2.1 Principe

a Gène rapporteur Smad-Gal4/UAS-luciférase

La technique de gènes rapporteurs Smad-Gal4/UAS-luciférase permet de discriminer la protéine Smad prioritairement recrutée dans la voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa.

Trois types de plasmides sont transfectés dans les cellules primaires de la granulosa. Le premier, le plasmide d'expression, code pour une protéine de fusion Smad-Gal4 (domaine de liaison à l'ADN de Gal4) (Liu, Hata et al. 1996). Ce plasmide existe pour chacune des Smads que l'on veut étudier (Smad1, Smad5 et Smad8). Le second, le plasmide rapporteur, code pour la luciférase placée sous le contrôle d'un promoteur contenant des séquences UAS, séquences de fixation spécifique de Gal4 (Vashee and Kodadek 1995). Le dernier plasmide transfecté, le plasmide pTK-RL (Promega) permet la normalisation de chaque échantillon. Le plasmide d'expression contrôle code uniquement pour le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (figure 32).

A



B

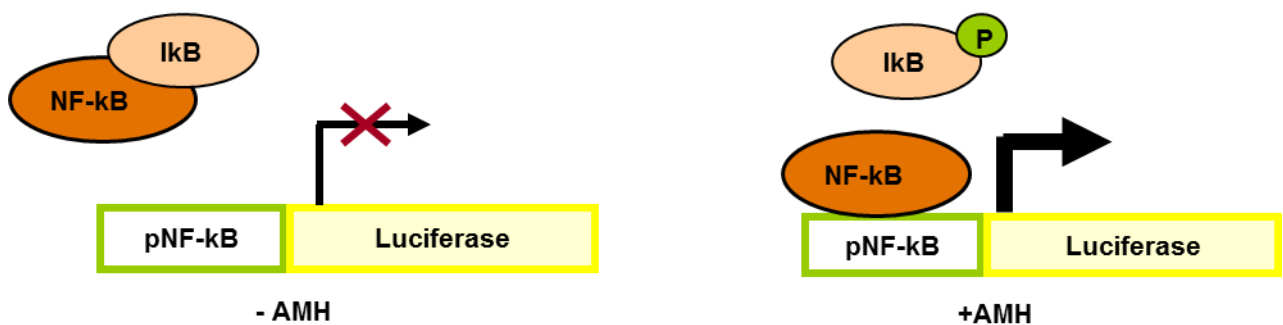


Figure 33 : Principe de la technique des gènes rapporteurs TOPflash et pNFkB-luc. (A) En absence d'activation (potentiellement par l'AMH), la β -caténine est principalement sous forme phosphorylée dans le cytoplasme. Cette forme est dégradée par le protéasome. Après stimulation, la β -caténine n'est alors plus phosphorylée, transloque dans le noyau et en association avec des facteurs de transcription TCF/LEF active le gène rapporteur luciférase. (B) En absence d'activation (potentiellement par l'AMH), le facteur NFkB est maintenu inactif dans le cytoplasme par le facteur IκB. Après stimulation, Le facteur IκB est phosphorylé et relargue NFkB qui peut aller activer le gène rapporteur luciférase dans le noyau.

b **Gènes rapporteurs TOPflash et pNFκB-luciférase**

Le vecteur TOPflash comprend un promoteur synthétique contenant des sites de liaison pour les facteurs nucléaires TCF/LEF.

Lorsque la voie β-caténine est activée, la β-caténine transloque dans le noyau et en association avec des facteurs TCF/LEF active l'expression de la luciférase. Cette construction a été transfectée dans des cellules de la granulosa en culture primaire pour vérifier si l'AMH activait ou non la voie β-caténine (figure 33A). La construction pNFκB-luc contenant des sites de liaison pour les facteurs nucléaires NFκB a été utilisée pour analyser le rôle potentiel de l'AMH sur cette voie. Le facteur NFκB est capable d'activer l'expression du gène rapporteur luciférase après libération de son facteur inhibiteur IκB (figure 33B).

2.2 Protocole

Les transfections ont été faites avec le kit FUGENE[®]HD (Roche). Pour chaque puits, 44 µl de milieu OPTI-MEM sont incubés avec 6 µl de FUGENE pendant 5 min. 500 ng total d'ADN est ajouté et le mélange est incubé 15 min. Le mélange de 50 µl est déposé sur les cellules sans changer le milieu.

a **Vecteur β-galactosidase et Vecteur pMax-GFP**

Afin d'évaluer l'efficacité de transfection des cellules primaires de la granulosa, le vecteur codant pour la β-galactosidase ou la GFP sont transfectés à 1µg/puits à l'aide du kit FUGENE[®]HD. Les cellules sontensemencées sur des Labtek[®] 4 puits à une concentration de 1x10⁵ cellules par puits et cultivées 24 h. Les cellules sont ensuite transfectées comme décrit précédemment et cultivées 48 h supplémentaires. 48 h après la transfection, l'expression de l'enzyme *in situ* est visualisée par coloration LacZ sur le tapis cellulaire fixé avec 4% PFA. Les puits sont rincés puis incubés dans la solution de coloration (phosphate 0.1M pH 7.3, deoxycholate 0.1%, NP-40 0.2%, MgCl₂ 2mM, K Ferri 5mM, K Ferro 5mM, X-Gal 1mg/ml) pendant 1 h à 37°C. Le pourcentage de cellules bleues (coloration LacZ) ou fluorescentes (GFP) visualisées au microscope correspond au pourcentage de transfection.

b ***Lecture de l'activité luciférase***

Les cellules sont rincées au PBS 1X puis lysées avec 500 µl de tampon « Passive lysis Buffer » (Promega) par puits. Les cellules sont grattées et centrifugées 1 min à 10 000 rpm. 20 µl de lysat de chaque échantillon est prélevé pour la lecture des activités luciférase Firefly pour UAS-luciférase et Renilla pour pTK-RL. La lecture est réalisée à l'aide du kit Dual-Luc (Promega) dans le lecteur de plaque Mithras LB 940 (Berthold Technologies). Les résultats sont présentés sous la forme Firefly luc/Renilla Luc.

c ***Transfection de petits ARN interférents (siRNA)***

Cette technique a été utilisée pour déterminer l'identité des différents acteurs de la cascade de signalisation de l'AMH dans les cellules primaires de la granulosa. Trois siRNA différents ont été utilisés pour cibler différentes séquences de chaque gène cible. La diminution de l'expression de chaque gène cible a été validée en q-PCR (voir chapitre suivant) après transfection de chaque siRNA. Pour chaque gène, seul le siRNA qui engendrait la plus forte diminution a été gardé pour la suite de l'étude.

Les siRNA pour *Acvr1* (59932), *Bmpr1a* (160872), *Bmpr1b* (60258), et le contrôle négatif siRNA #1 ont été achetés chez Ambion (Life Technologies) et le siRNA *Rgmb* (J05553408) chez Dharmacon (Fisher Scientific, Illkirch, France). Le siRNA GAPDH-cy3 (4390849) utilisé pour tester l'efficacité de transfection des cellules de la granulosa en culture primaire a été acheté chez Life technologies.

Pour chaque puits, 100 nM final de siRNA dirigés contre les différents gènes cibles (Silencer pre-designed siRNA, Ambion) sont ajoutés à 175 µl de milieu OPTI-MEM (Life Technologies) et 3 µl d'Oligofectamine™ (Invitrogen) sont incubés 5 min avec 12 µl du même milieu. Les deux solutions sont mélangées et incubées 15 min à température ambiante. Chaque puits est rincé et 800 µl de milieu OPTI-MEM sont ajoutés. 200 µl du milieu contenant les siRNA sont ensuite déposés goutte à goutte. La transfection est arrêtée au bout de 3 h par changement de milieu (DMEM sans rouge de phénol, 1% SVF, 1% antibiotiques).

Oligos	Séquence (5'-3')	produit de PCR	sonde UPL associée
mHprt-474-s	TCA-ACG-GGG-GAC-ATA-AAA-GT	91	22
mHprt-565-a	CCA-GTG-TCA-ATT-ATA-TCT-TCA-ACA-ATC		
mAmhr2-393-s	TGA-CTT-CTG-CAA-TGC-CAA-TTA	129	16
mAmhr2-522-a	GAG-AAA-CAT-TCC-CAG-GAG		
mAlk2-978-s	AGG-GCT-CAT-CAC-CAC-CAA-T	76	94
mAlk2-1053-a	GCC-ACT-TCC-TGA-TGT-ACA-CG		
mAlk3-875-s	CTC-ATT-TCC-ATG-GCT-GTC-TG	95	78
mAlk3-969-a	CGA-CCC-CTG-CTT-GAG-ATA-CT		
mAlk6-837-s	GGA-GCA-GGA-CGA-GAC-ATA-CAT	120	80
mAlk6-956-a	TGC-TTA-GCT-ATT-GTC-CTT-TGG-A		
mRGMa-s-UPL	CGC-CCT-ACA-CCT-AGT-CTT-CG	99	19
mRGMa-a-UPL	GAT-TTT-GCA-GGG-GGA-GAT-G		
mRGMb-s-UPL	GAG-TTT-TGC-AAG-GCA-CTT-CG	60	71
mRGMb-a-UPL	GCA-GGC-CTT-TGA-AGT-TCG		
mRGMc-s-UPL	GCT-TGA-CCT-CGG-GAA-ACA-T	129	20
mRGMc-a-UPL	ACC-GGG-GAC-TAG-GGG-ACT		
marom-1052-s	ATC-CAC-ACT-GTT-GTG-GGT-GA	95	31
marom-1146-a	TGG-TAC-CGC-ATG-CTT-TCA		
mSmad1-1370-s	AAC-ACC-AGG-CGA-CAT-ATT-GG	76	91
mSmad1-1445-a	CAC-TGA-GGC-ATT-CCG-CAT-A		
mSmad4-1858-s	CCG-TGG-GTG-GAA-TAG-CTC	63	84
mSmad4-1920-a	GGT-CAT-CCA-CAC-CGA-TGC		
mCxcl2-324-s	CCT-GGT-TCA-GAA-AAT-CAT-CCA	93	85
mCxcl2-416-a	CTT-CCG-TTG-AGG-GAC-AGC		
mIEX1-218-s	CAG-CCG-AAG-GGT-GCT-CTA-C	113	2
mIEX1-330-a	AAA-TCT-GGC-AGA-AGA-TGA-TGG		
mJun-2869-s	CCA-GAA-GAT-GGT-GTG-GTG-TTT	63	11
mJun-2931-a	CTG-ACC-CTC-TCC-CCT-TGC		
mScC-1423-s	TGG-AGA-TGA-CCA-TCC-TCC-TTA	72	67
mScC-1494-a	CCA-CAT-CAC-GGA-GAT-TTT-GA		
mLHR-653-s	GAT-GCA-CAG-TGG-CAC-CTT-C	127	31
mLHR-779-a	GTA-GGA-TGA-CGT-GGC-GAT-G		
m3betaHSD-81-s	TGT-GAC-CAT-TTC-CTA-CAT-TCT-GA	75	66
m3betaHSD-155-a	CCA-GTG-ATT-GAT-AAA-CCT-TAT-GTC-C		
m17betaHSD-79-s	CGT-TCC-CAG-AGC-TTC-AAA-GT	93	98
m17betaHSD-171-a	AGG-AGG-GCA-TCC-TTG-AGT-C		
mF SHR-398-s	ACC-CTG-AGG-CCT-TCC-AGA	69	48
mF SHR-466-a	AGT-GTT-TAA-TGC-CTG-TGT-TGG-A		
mINH4-405-s	GGA-AGA-TGT-CTC-CCA-GGC-TA	61	33
mINH4-465-a	TGG-CTG-GTC-CTC-ACA-GGT		
mStar-312-s	TTG-GGC-ATA-CTC-AAC-AAC-CA	65	11
mStar-376-a	ACT-TCG-TCC-CCG-TTC-TCC		
mSmad5-1167-s	GCA-GTA-ACA-TGA-TTC-CTC-AGA-CC	61	107
mSmad5-1227-a	GCG-ACA-GGC-TGA-ACA-TCT-C		
mSmad8-389-s	ACC-ATT-ACC-GCA-GAG-TGG-AG	73	16
mSmad8-461-a	TGA-GGG-TTG-TAC-TCG-CTG-TG		
mSmad4-1482-s	ACT-GTG-GAT-GGC-TAT-GTG-GAT	113	52
mSmad4-1920-a	CCT-TTG-CCT-ATG-TGC-AAC-CT		
mId1-470-s	GCG-AGA-TCA-GTG-CCT-TGG	124	19
mId1-593-a	TTT-TTC-CTC-TTG-CCT-CCT-GA		
mId2-332-s	ACT-ATC-GTC-AGC-CTG-CAT-CA	122	85
mId2-453-a	AGC-TCA-GAA-GGG-AAT-TCA-GAT-G		
mId3-724-s	GAG-GAG-CTT-TTG-CCA-CTG-AC	128	19
mId3-851-a	GCT-CAT-CCA-TGC-CCT-CAG		
mJunD-849-s	AAA-CAG-AGA-GGC-AGA-TCT-AGA-GG	83	91
mJunD-849-as	TGT-CCCTAC-CCT-GCT-GTT-TC		
mJunB-115-s	CCA-CGG-AGG-GAG-AGA-AAA-TC	60	107
mJunB-174-as	AGT-TGG-CAG-CTG-TGC-GTA-A		
mFos-260-s	GGC-TCT-CCT-GTC-AAC-ACA-CA	126	22
mFos-385-as	GAC-CAG-AGT-GGG-CTG-CAC		
mFosl2-645-s	CAG-CCA-AGT-GTC-GGA-ACC	95	11
mFosl2-739-as	CTC-TTT-CTG-CAG-CCC-AGA-CT		
mFosB-1092-s	GTT-CGC-AGA-GAG-CGG-AAC	107	71
mFosB-1198-as	GCC-TTT-TCC-TCT-TCA-AGC-TG		
mFosl1-259-s	CCG-AGA-CTA-CGG-GGA-ACC	121	84
mFosl1-379-as	GCT-TGG-CAC-AAG-GTG-GAA		
mCx43-150-s	TCC-TTT-GAC-TTC-AGC-CTC-CA	87	31
mCx43-236-as	CCA-TGT-CTG-GGC-ACC-TCT		
mOtxr-888-s	GTG-CAG-ATG-TGG-AGC-GTC-T	84	29
mOtxr-971-as	GTT-GAG-GCT-GGC-CAA-GAG		
mAMHupl-s	AGG-TGG-AGG-CTC-TTG-GAA-CT		41
mAMHupl-as	GGC-TAG-GGG-AGA-CTG-GAG-AA		
mAngptl7-770-s	TAT-CCA-CCG-GCT-CAC-CAG	78	78
mAngptl7-847-a	TCT-GCG-TAG-CGT-GCA-TTG		
mKcnj2-1270-s	CAA-TGC-CAG-ACT-TTG-AAA-TTG-TTG	78	22
mKcnj2-1347-a	GAA-CTC-CGG-CAT-TGA-GTT-GT		
mTdg-262-s	CCA-GGA-ACC-TGC-ACC-AGA	83	84
mTdg-344-a	TTT-TGG-GCT-CCA-CTG-GTT		
mOvqp1-522-s	GAG-GCC-CTG-CTC-ACT-CAG	126	66
mOvqp1-647-a	CAA-AAC-ATT-AAT-GAA-ATC-CAA-ACG		

Tableau 10 : Amorces et sondes utilisées en PCR et en q-PCR

Le siRNA GAPDH-cy3 (4390849, Life Technologies) utilisé pour définir l'efficacité de transfection des CG a été transfecté comme décrit dans le paragraphe précédent et la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson).

VI Extraction d'ARN, RT, PCR, q-PCR

1 Extraction des ARN totaux

Les ARN sont extraits à partir de cellules en culture ou d'ovaire total selon le protocole du kit Mini Plus RNeasy (Qiagen). Dans le cas de l'ovaire total ou de l'utérus, une étape de broyage préalable dans 600 µl de tampon RLT Plus supplémenté avec 1% β-Mercaptoéthanol (β-ME) est réalisée. Les cellules sont lysées avec 350 µl d'une solution RLT Plus, 1% β-ME pour stabiliser les ARNs. L'homogénat cellulaire est passé sur une colonne ADNg eliminator permettant d'éliminer l'ADN génomique. 350 ou 600 µl d'éthanol 70% sont ajoutés au lysat pour faciliter la fixation des acides nucléiques sur la colonne. L'ensemble est passé sur une colonne RNeasy et centrifugé 15 s à 8000 g. Les ARNs fixés sur la membrane sont lavés avec 700 µl de tampon RW1 et deux fois avec 500 µl de tampon RPE. Une étape de centrifugation est réalisée à vide pendant 1 min à 8000 g pour permettre l'élimination des traces d'éthanol de la colonne. Les ARNs totaux sont élués dans 30 µl d'H₂O stérile. Les échantillons d'ARNs sont dosés par spectrophotométrie à 260 et 280 nm à l'aide de l'appareil Biophotometer Plus (Eppendorf) ou du nanodrop (Thermo scientific). Les ARNs sont conservés à -20°C pour être utilisés le jour suivant.

2 Synthèse d'ADN complémentaire : transcription inverse (RT)

La transcription inverse est réalisée à l'aide du kit Omniscript Reverse Transcription (Qiagen). De 700 ng à 2 µg d'ARN sont incubés en présence de tampon de réaction (RT), de 0.5 mM de dNTP, de 1 µM d'oligodT, de 10 µM de random hexamer, de 20U de RNase inhibitor et de 4U/20µl d'Omniscrypt reverse transcriptase. Les échantillons sont placés 1 h à 37°C pour la transcription. Un contrôle négatif est réalisé sans transcriptase inverse (RT-).

3 PCR

Pour une réaction de PCR, 2 µl de cDNA (obtenus précédemment grâce à la RT) sont incubés en présence de tampon PCR, de 250 µM de dNTP, d'amorces à 0.75 µM final (mélange des différentes amorces sens et antisens) (Tableau 10), de 1.5 mM MgCl₂, et de

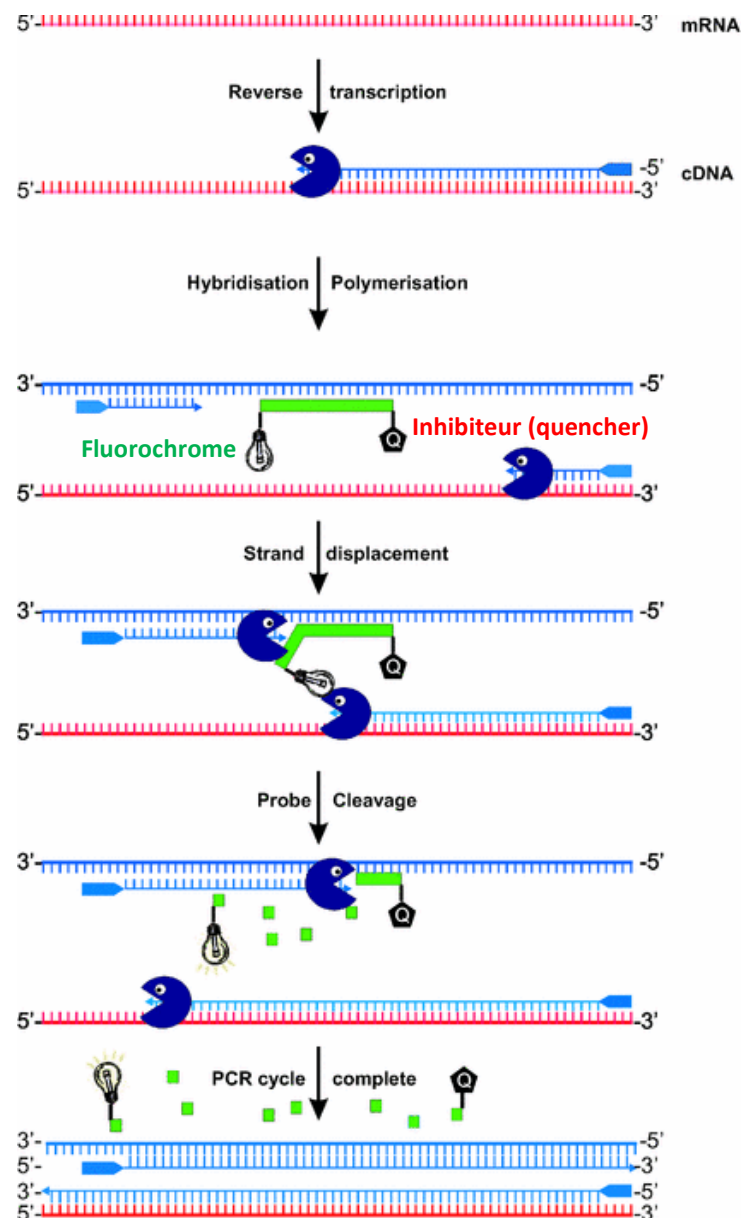


Figure 34 : Principe de la q-PCR Taqman. Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence (Bustin and Mueller 2005).

2.5U/100µl d'enzyme Taq Hotstar (Qiagen). La PCR se déroule comme décrit précédemment dans le paragraphe « géotypage ».

4 PCR en temps réel (q-PCR)

Les ARNs sont extraits à l'aide du protocole RNeasy plus mini kit (Qiagen) et les ADNc sont synthétisés selon le protocole de transcription inverse décrit précédemment à l'aide du kit Omniscript Reverse Transcription (Qiagen).

La technique de PCR quantitative se fait par détection en temps réel de la fluorescence (technologie TaqMan®) (figure 34). Le kit LightCycler 480 Probes Master (Roche) est utilisé pour la réalisation du mélange de q-PCR et la réaction s'effectue dans l'appareil Roche LightCycler480. Le mélange réactionnel pour un puits comprend 10 µl de Master contenant l'enzyme Hotstar, 2 µl d'un mélange d'amorces (sens et antisens à 5 µM final) et de sonde (à 1 µM final) (tableau 10) complété avec 3 µl d'H₂O. 15 µl du mélange est déposé dans chacun des 96 puits de la plaque de q-PCR (Roche). 5 µl de produits de la gamme standard correspondant à un nombre précis de molécules d'ADN (de 1x10³ à 1x10⁸ molécules par µl) ou d'échantillons à mesurer (dilués au 1/5ème) sont ajoutés en duplicata aux 15 µl de mélange de q-PCR. La q-PCR est réalisée selon le programme suivant : une première étape d'activation de l'enzyme est réalisée à 95°C pendant 10 min, suivie de 45 cycles d'amplification (10 s à 95°C, 30 s à 60°C, 1 s à 72°C). Les résultats sont analysés en établissant le rapport de la concentration du transcrit du gène d'intérêt sur la concentration du transcrit du gène de ménage utilisé, ici Hprt (Hypoxanthine phosphoribosyl transferase).

5 Macro-array (RT² Profiler PCR array)

5.1 Principe

Le Macro-array (RT² Profiler PCR-array, SABiosciences) permet de réaliser simultanément 96 q-PCR sur différents gènes. Cette technique a été utilisée pour identifier des gènes cibles de l'AMH dans l'utérus. Nous avons choisi de tester la plaque TGF-β/BMP signaling pathway PCR Array qui permet de tester 84 gènes d'intérêts (plus 12 contrôles) en rapport avec ces deux voies de signalisation.

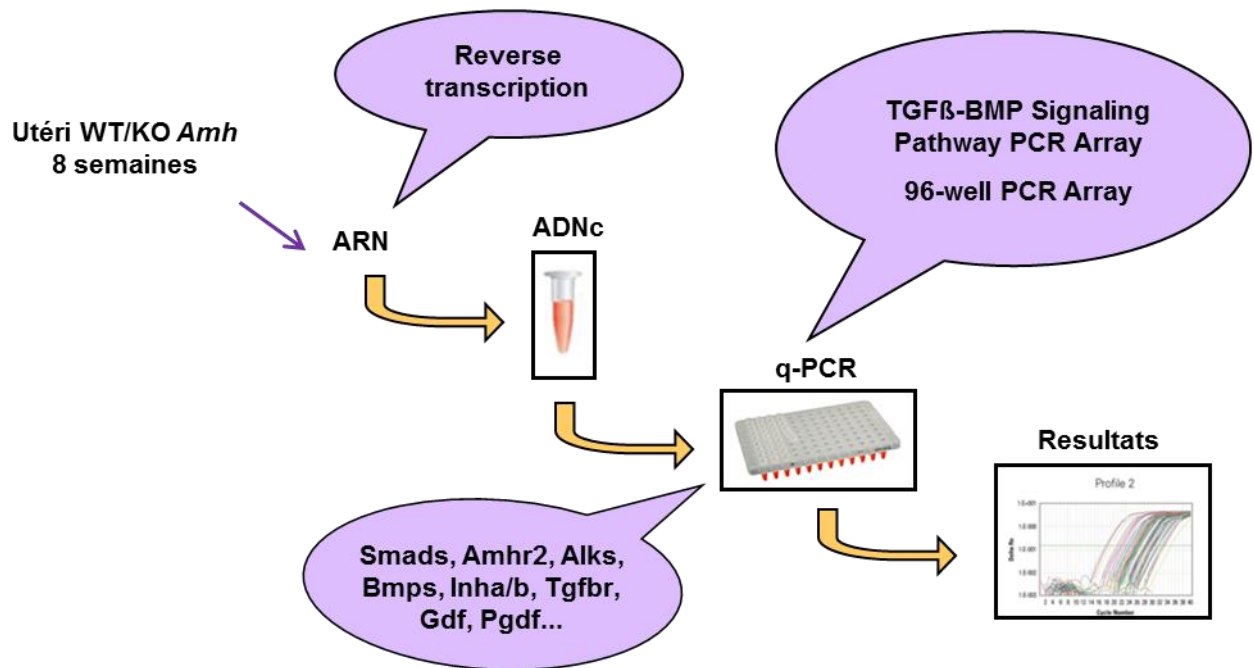


Figure 35 : Protocole du Macro-array (RT² Profiler PCR array). Suite à la collecte des échantillons de CG et d'utéri, les ARN sont récupérés et sont analysés pour s'assurer de leur intégrité et de leur pureté. Une étape de transcription inverse est ensuite réalisée. Les ADNc obtenus vont être analysés par q-PCR. Les plaques choisies permettent l'étude de 84 gènes simultanément. Les gènes testés sont impliqués dans les voies de signalisation du TGF- β et des BMPs.

5.2 Protocole

Les utéri WT et KO pour l'*Amh* sont prélevés chez des femelles à 0,5 jpc. L'ARN des des utéri est ensuite extrait selon le protocole décrit précédemment avec le kit RNeasy Mini Plus et dosé par spectrophotométrie. Pour s'assurer de son intégrité, 2µg d'ARN sont déposés sur gel d'agarose 1% contenant du BET. Cela permet de visualiser les ARN ribosomiques 18S et 28S ainsi que les ARN messagers.

L'ADN génomique résiduel est éliminé en incubant 1.5 µg d'ARN pendant 5 min à 42°C avec une solution de Genomic DNA Elimination (10 µl final). La transcription inverse est réalisée à l'aide du kit RT² First strand (SABiosciences). Pour une réaction de RT, on mélange 4 µl de BC3 (5X RT buffer 3), 1 µl de P2 (Primer & external control Mix), 2 µl RE3 (RT Enzyme Mix 3), 3 µl H2O auxquels on ajoute les 10 µl d'ARN. Le mélange de RT est incubé exactement 15 min à 45°C. La réaction est stoppée par chauffage à 95°C pendant 5 min. Les ADNc sont dilués 5 fois et sont conservés à -20°C. Le mélange de q-PCR est réalisé à l'aide du kit RT² Real Time Sybergreen PCR. Pour une plaque 96 puits on mélange 1350 µl de master mix SABiosciences RT2 2X, 102 µl d'ADNc et 1248 µl d'eau. On dépose ensuite 25 µl du mélange dans chaque puit. La q-PCR a été réalisée à l'aide du LightCycler480 selon le programme suivant : une première étape de dénaturation se fait à 95°C pendant 10 min suivie de 45 cycles d'amplification (15 s à 95°C, 1 min à 60°C). Une courbe de dissociation permet de s'assurer de la qualité de la q-PCR (figure 35).

VII Analyse protéique

1 Extraction

Les cellules sont rincées dans une solution 50 mM Tris HCl (pH7,4)/150mM NaCl supplémentée avec 1% d'antiprotéases (Protéase inhibitor cocktail, 1mM PMSF, 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml pepstatine) puis lysées dans ce même tampon supplémenté avec 1% de Triton. La lyse s'effectue à 4°C sous agitation pendant 20 min et est suivie d'une centrifugation de 5 min à 4°C à 8000 g qui permet d'éliminer les débris cellulaires.

2 Dosage protéique

Le dosage des protéines est effectué par colorimétrie à l'aide du kit BCA Protein Assay (Pierce). Le lysat protéique (20 µl) est solubilisé dans 100 µl de NaOH 0.5N pendant 30 min à 37°C sous agitation, puis neutralisé avec 100 µl d'HCl 0.5N. Une gamme d'étalonnage (7 points) à partir d'une solution mère de BSA à 2 mg/ml est réalisée en parallèle. Elle permet de détecter des concentrations protéiques entre 5 µg/ml et 750 µg/ml. La densité optique est mesurée à 550 nm. Le calcul des concentrations à partir de la gamme d'étalonnage a été effectué par un logiciel (Biolinx).

3 Western Blot

De 7 à 20 µg de protéines ont été utilisés selon les expériences et selon les quantités de protéines récupérées par échantillon. Du tampon Laemmli est ajouté à chaque lysat protéique. Les échantillons sont dénaturés, puis déposés sur un gel de polyacrylamide 4-20% (Biorad). La migration est réalisée dans un tampon Tris 25 mM, 0.1% SDS, glycine 0.192 M à 200V pendant 30 min. Après migration, les protéines ayant migré dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 30 min à 100V dans un tampon Tris 25 mM, 20% éthanol, glycine 0,192 M. La membrane de transfert est rincée, incubée 1 h dans du tampon de saturation (lait en poudre 5%, TBS 1X, Tween 20 1%) et enfin incubée avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C (PSmad1/5/8 : polyclonal de lapin 1/500 (Cell Signaling), PSmad2 : polyclonal de lapin 1/500 (Cell Signaling), Pb-catenine : polyclonal de lapin 1/500 (Cell Signaling), P-IkB polyclonal de lapin 1/500 (Cell Signaling), AMH polyclonal de chèvre 1/200 (Santa cruz), β-Actine : monoclonal de souris 1/5000 (Sigma)). Après plusieurs rinçages au TBS, la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (1/5000) puis à nouveau rincée avec du TBS. La révélation s'effectue à l'aide du kit de révélation West Pico (Amersham) par chimioluminescence. La membrane est incubée 5 min dans le produit de révélation puis séchée et placée dans la cassette autoradiographique. Les résultats sont analysés par autoradiographie de la membrane. L'analyse des bandes spécifiques s'effectue grâce à des étalons de masse moléculaire.

VIII Puces à ADN (micro-array)

1 Principe

Les puces à ADN, encore appelées biopuces ou micro-array sont à l'heure actuelle les plus adoptées pour des études de transcriptome. Le principe de base des puces à ADN repose sur l'hybridation d'un mélange complexe d'ADN marqué, à des séquences d'ADN complémentaires connues fixées sur un support solide à des positions déterminées.

Les puces à ADN permettent de comparer le transcriptome complet de cellules ou de tissus dans des conditions différentes.

J'ai utilisé cette technologie pour deux analyses différentes complémentaires. D'une part, j'ai comparé le transcriptome des ovaires issus de souris contrôles (WT) avec des ovaires issus de souris KO pour l'*Amh*. D'autre part, j'ai étudié le transcriptome des cellules de la granulosa contrôles exposées ou non à de l'AMH (40 nM) pendant 6 h et 24 h. Cette technique m'a permis de définir de nouveaux gènes cibles de l'AMH dans l'ovaire et plus particulièrement dans les cellules de la granulosa.

2 Echantillons

2.1 Transcriptomes ovaires WT et KO *Amh*

Pour la comparaison des transcriptomes des ovaires WT et KO *Amh*, des souris de 3 semaines immatures WT ou KO *Amh* ont été prélevées. Pour réaliser un échantillon, les ARN extraits d'ovaires de 3 souris ont été poolés.

2.2 Transcriptome des CG contrôles et des CG exposées à de l'AMH

Nous avons utilisé 3 cultures différentes chacune réalisée à partir d'ovaires de 3 souris. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 5×10^5 cellules par puits. Afin que toutes les cellules restent dans les mêmes conditions de culture, l'exposition prolongée à l'AMH (24h) est mise en place en premier lieu. Ainsi, 36h après la mise en culture 3 puits ont été traités avec de l'AMH à 40 nM. 18h après le début de ce traitement long les 3 autres puits ont été traités pendant 6h. Pour chaque culture, un puits n'a pas été exposé à l'AMH et représente l'échantillon contrôle. Toutes les cultures sont ainsi arrêtées simultanément.

A



Gel contenant l'intercalant fluorescent

Marqueur de poids moléculaires

Échantillons 1 à 12

B

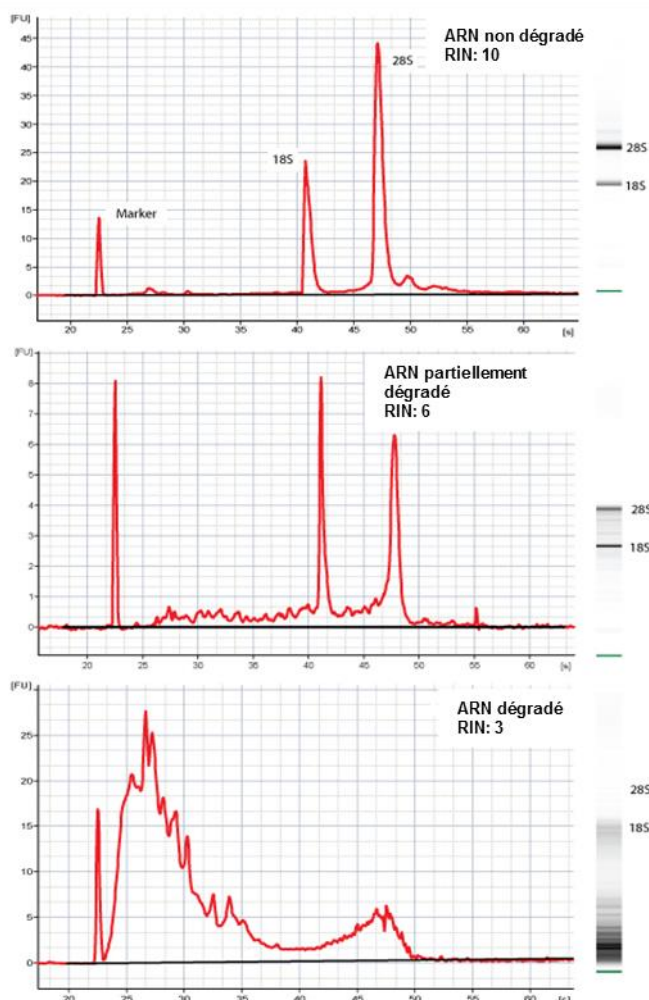


Figure 36 : Contrôle des ARN sur puce agilent.

La puce permettant de contrôler la qualité des ARN est une puce agilent nano labChip (A). Dans chacun des 12 puits « échantillons », un gel contenant un intercalant fluorescent va être déposé. Puis 1 μ l de chaque échantillon va être ajouté. Un marqueur de poids moléculaires est également déposé dans un puit séparé. Ceci permet d'évaluer la taille des ARN. Les ARN vont migrer sur gel et la fluorescence va être relevée. La migration et la lecture de fluorescence se fait dans l'appareil agilent 2100 bioanalyser. Seul les ARNs présentant un RIN (RNA integrity number) supérieur à 8 ont été utilisés car considérés comme non dégradés (B).

3 Protocole

3.1 Analyse des ARN

Les ARN ont été extraits à partir d'ovaire entier (RNeasy mini kit) ou de cellules de la granulosa isolée (RNeasy micro kit). Ces ARN ont été contrôlés (pureté et intégrité) à l'aide d'une puce agilent (Agilent RNA 6000 nano kit) et d'un Bioanalyser (Agilent Bioanalyser 2100) (figure 36).

La puce agilent nano chip est composée de plusieurs puits, dont 12 destinés aux échantillons, et 1 au marqueur de Poids Moléculaire (PM).

Un intercalant de l'ARN spécifique et fluorescent est déposé dans chaque puits. Les ARN, préalablement dénaturé pendant 2 min à 70°C, sont ensuite ajoutés. La puce est vortexée afin d'homogénéiser le tampon et les échantillons, puis placée dans l'appareil (Agilent 2100 bioanalyser). Le marqueur de PM sert d'étalon aux niveaux qualitatif et quantitatif.

Le logiciel de traitement des données indique pour chaque échantillon son RIN (RNA integrity number). Ce nombre, compris entre 1 et 10, doit être supérieur à 8 pour pouvoir considérer que les ARN sont intègres (figure 36).

3.2 Préparation des échantillons

Chaque échantillon est réalisé pour obtenir 250 ng d'ARN final dans un volume de 3 µl. 2 µl d'ARN polyA (Affymetrix GeneChip Poly-A control kit) sont ajoutés à chaque échantillon pour faciliter les réactions et augmenter le rendement. Un ARN contrôle est utilisé en parallèle des échantillons d'intérêts.

3.3 Déroulement de l'expérience

- ***Synthèse d'ADNc***

La synthèse du premier brin d'ADNc se fait dans 10 µl en présence du tampon de synthèse et de l'enzyme (Ambion WT expression kit). Les échantillons sont placés 1 h à 25°C, 1 h à 42°C et 2 min à 4°C (figure 37).

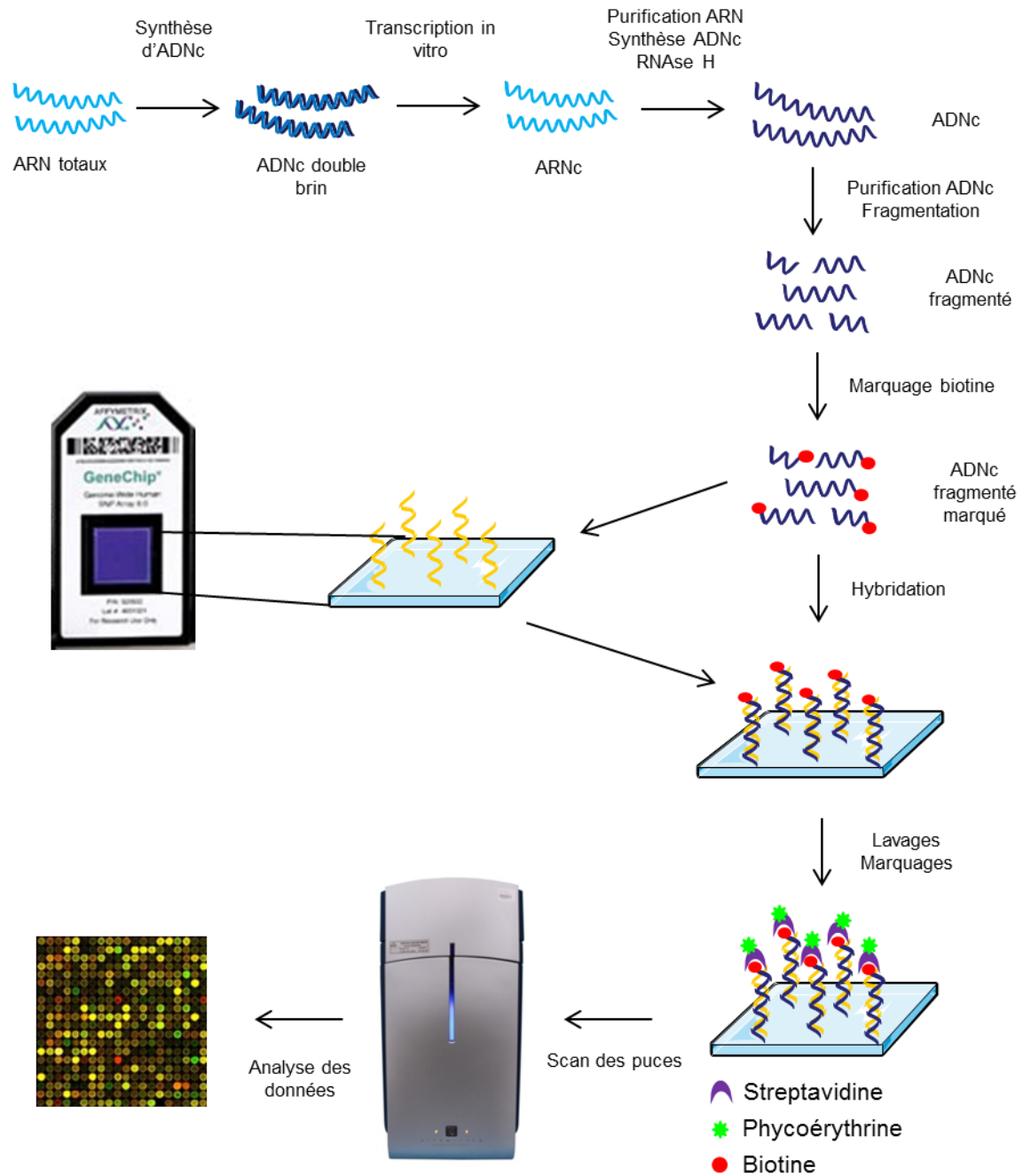


Figure 37 : protocole du micro-array. Après extraction de l'ARN total, des étapes successives de synthèse d'ADNc et de transcription in vitro permettent d'amplifier le matériel. L'ADNc va ensuite subir une fragmentation et un marquage. L'ADNc marqué à la biotine est hybridé sur une puce contenant des centaines de milliers de séquences complémentaires appelées sondes. Il existe plusieurs sondes par gènes. Suite à l'hybridation une série de lavages et de marquages va être réalisée. Le marquage streptavidine-phycoérythrine permet d'amplifier le signal. Les puces sont ensuite scannées et analysées grâce à un logiciel bioinformatique.

Aux 10 µl du milieu de synthèse du premier brin d'ADNc sont ajoutés 50 µl de milieu de synthèse du second brin d'ADNc contenant de l'eau, du tampon et de l'enzyme. Les échantillons sont ensuite placés 1 h à 16°C, 10 min à 65°C et 2 min à 4°C.

- ***Transcription in vitro***

Suite à cette synthèse d'ADNc, une étape de transcription in vitro va être réalisée. 30 µl d'un milieu contenant du tampon et l'enzyme permettant la transcription in vitro sont ajoutés aux 60 µl d'ADN. Les échantillons sont ensuite placés 16 h à 40°C (figure 37).

- ***Purification des ARN***

Suite à la transcription in vitro, l'ARN est purifié par liaison sur des billes magnétiques. Les ARN sont dosés à l'aide du nanodrop et analysés sur puce agilent comme décrit précédemment (figure 37).

- ***Second cycle de synthèse d'ADNc***

10 µg d'ARN sont repris dans de l'eau. Des random primers sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite placés 5 min à 70°C, 5 min à 25°C et 2 min à 4°C dans un thermocycleur. Un second cycle de synthèse d'ADNc est ensuite réalisé. Les échantillons sont ensuite placés en présence d'un tampon contenant l'enzyme nécessaire à la synthèse d'ADNc. La synthèse se déroule selon le programme suivant : 10 min à 25°C, 90 min à 42°C, 10 min à 70°C et 2 min à 4°C.

- ***Hydrolyse à la RNase H***

Pour éliminer les ARN encore présents dans les échantillons, ces derniers sont placés en présence de RNase H pendant 45 min à 37°C, 5 min à 95°C et 2 min à 4°C. Après une brève centrifugation, les échantillons sont conservés toute la nuit à -20°C.

- ***Purification des ADNc***

Les ADNc sont également purifiés par liaison aux billes magnétiques. Ils sont ensuite dosés à l'aide du nanodrop. Une concentration minimale de 180 ng/µl est requise pour continuer l'expérience.

- ***Fragmentation de l'ADNc simple brin et marquage***

Le mix de fragmentation est ajouté à 5.5 µg d'ADNc (Affymetrix GeneChip WT Terminal labeling kit). Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur 60 min à 37°C, 2 min à 93°C et 2 min à 4°C. L'ADNc est à nouveau dosé et analysé sur puce agilent pour s'assurer de la bonne réalisation de cette étape.

L'ADNc fragmenté est ensuite marqué à la biotine par incubation pendant 1h à 37°C puis 10 min à 70°C dans un tampon spécifique.

- ***Hybridation sur la puce***

Les ADNc fragmentés et marqués sont repris dans un tampon d'hybridation spécifique et 130 µl de ce mélange vont être injectés dans la puce par un septum situés à l'arrière de celle-ci. Il faut veiller à ce qu'une bulle d'air persiste pour permettre d'homogénéiser la solution d'hybridation contenant les fragments marqués. L'hybridation se déroule pendant environ 17 h dans un four à 45°C sous agitation.

- ***Rinçages, marquage fluorescent et lecture des puces***

Les puces sont rincées à l'aide d'une plateforme de rinçage. Les ADNc hybridés sur les puces sont marqués à l'aide d'un complexe streptavidine-phycoérythrine. La streptavidine présente une haute affinité pour la biotine déjà présente sur les fragments d'ADN et la phycoérythrine va émettre de la fluorescence mesurée par un scanner à 570 nm (Scanner Affymetrix). Une fois les puces scannées, une cartographie en nuance de gris est obtenue et un logiciel va permettre de relier les intensités de fluorescence avec les sondes disposées sur la puce. Ceci permet donc d'obtenir le niveau d'expression de chaque gène.

3.4 Analyse bioinformatique des données

L'analyse des données obtenues a été réalisée en collaboration avec Frédéric Chalmel, bioinformaticien chargé de recherche au sein de l'unité INSERM 1085. En 2008, un logiciel de traitement de données nommé AMEN (Annotation Mapping Expression and Network) a été développé pour traiter et normaliser les données brutes obtenues suite à la lecture des puces (Chalmel and Primig 2008). Ce logiciel permet également de réaliser les filtrations statistiques nécessaires à l'identification des gènes dont l'expression est significativement modifiée. Le logiciel intègre également les annotations des gènes disponibles dans les

banques de données publiques. Cette option permet de réaliser des analyses fonctionnelles. En effet, il sera donc possible de regrouper les gènes qui participent à une même fonction cellulaire.

Résultats

I Voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa immatures

Publication : Anti-Müllerian hormone recruits BMPR-IA in immature granulosa cells (Plos One)

1 Synthèse de l'article

1.1 Introduction

L'AMH est un membre de la famille TGF- β produite par les cellules somatiques des ovaires et des testicules. Son rôle principal est d'induire, lors de la différenciation sexuelle mâle, la régression des canaux de Müller : les ébauches des trompes et de l'utérus chez la femelle (Jost 1953). Chez la souris, l'AMH ovarienne contrôle le recrutement des follicules primordiaux et la maturation folliculaire (Durlinger, Kramer et al. 1999 ; Durlinger, Gruijters et al. 2001). L'AMH agit via une voie de signalisation commune aux BMPs. Elle transduit ses effets par l'intermédiaire de deux récepteurs transmembranaires à serine/thréonine kinase de type I et II, deux effecteurs cytoplasmiques, les Smads spécifiques (R-Smad) et une protéine Smad commune à tous les ligands, Smad4. Après fixation de l'AMH sur son récepteur spécifique de type II (AMHR-II), celui-ci recrute et phosphoryle le récepteur de type I. Dans le cas de l'AMH, les récepteurs de type I peuvent être ActR-IA, BMPR-IA ou BMPR-IB. Une fois phosphorylé, le récepteur de type I recrute et phosphoryle à son tour les Smads spécifiques (Smad1, 5 ou 8) qui s'associent avec Smad4 et l'ensemble est transloqué dans le noyau. Ces complexes R-Smads/Smad4 vont alors s'associer avec des facteurs de transcription pour activer ou inhiber des gènes cibles potentiels. Le récepteur de type II (AMHR-II) est exprimé dans l'ovaire dès sa formation et son expression y est constante tout au long de la vie (Baarends, Hoogerbrugge et al. 1995). AMHR-II est exprimé principalement dans les cellules de la granulosa (CG) des follicules primaires et pré-antraux.

Plusieurs groupes ont utilisé différentes approches pour identifier les récepteurs de type I et les voies de signalisation de l'AMH dans les gonades et le canal de Müller. Certaines de ces études ont impliqué la mise en place de lignées murines mutantes conditionnelles. En effet, l'inactivation génique des récepteurs de type I (*Acvr1* et *Bmpr1a*) et des protéines Smads (*Smad1* et *Smad5*) conduit à une mort embryonnaire précoce avant 10,5 jours post-coïtum (jpc) (Gu, Reynolds et al. 1999 ; Mishina, Suzuki et al. 1995) (cf tableau 6 de l'introduction

page 84). La génération de la lignée murine *Amhr2-cre* a permis le ciblage de l'inactivation génique dans les cellules exprimant *Amhr2*. Cette approche a montré l'importance majeure de BMPR-IA dans le processus de régression müllérienne ainsi que la redondance entre les différentes protéines Smads (Jamin, Arango et al. 2002 ; Orvis, Jamin et al. 2008). Cependant, tous ces éléments de la cascade de signalisation de l'AMH n'ont pas été identifiés dans les CG. De plus, on ne connaît, à l'heure actuelle, aucun corécepteur de l'AMH. Comme cette hormone partage sa voie de signalisation avec les BMPs, les corécepteurs de ces derniers, notamment les Repulsive Guidance molecules (RGMa, b et c), semblent être de bons candidats pour l'AMH. Le but de ce projet a été de définir le (ou les) récepteur(s) de type I et la (ou les) Smad importants dans la voie de signalisation de l'AMH dans les CG. Nous avons également cherché à évaluer le rôle des RGMs dans cette voie de signalisation.

Nous avons montré dans cette étude que l'AMH transmet son signal via le récepteur de type I BMPR-IA et les Smad 1 et 5. De plus, nous avons mis en évidence l'expression de RGMb dans les GC mais ce corécepteur des BMPs ne semble pas essentiel à la transduction du signal de l'AMH.

1.2 Matériels et Méthodes

Pour débiter notre projet, nous avons besoin d'une culture de cellules de la granulosa facilement transfectable mais également capable de répondre à une exposition à l'AMH. Aucune lignée ne remplissant toutes les caractéristiques, nous avons utilisé une culture primaire de cellules de la granulosa murine. Cette culture est réalisée à partir d'ovaires de souris immatures de 3 semaines.

Pour l'étude des récepteurs de type I de l'AMH dans les CG, nous avons tout d'abord invalidé transitoirement chacun des récepteurs par transfection de siRNA dirigés contre ces récepteurs. Suite à cette transfection, nous avons analysé la capacité de réponse des CG à une exposition à l'AMH. Nous avons examiné par Western blot la phosphorylation des Smad1/5/8 et par q-PCR l'expression d'un gène cible de l'AMH, le gène *Id3*. L'invalidation transitoire de *Rgmb* a également permis d'étudier le rôle de ce corécepteur dans les CG. Pour confirmer nos résultats concernant les récepteurs de type I, nous avons ensuite évalué la capacité de réponse à l'AMH de CG isolées à partir d'ovaires issus de souris cKO pour *Acvr1* et *Bmpr1a*. Par ailleurs, la technique de gènes rapporteurs Smad/gal4-UAS/luciférase a été utilisée pour

déterminer la (ou les) Smad impliquée dans la voie de signalisation de l'AMH.

1.3 Résultats

a Caractérisation de la culture primaire de CG

La culture primaire de cellules de la granulosa a été préparée à partir d'ovaires de souris de 3 semaines immatures. A ce stade, l'ovaire est composé en majorité de petits follicules en croissance qui ne présentent que peu de cellules de la thèque. Pour débiter notre étude, nous avons vérifié plusieurs paramètres de la culture primaire de cellules de la granulosa, tels que la pureté, l'efficacité de transfection ou encore la réponse à une stimulation à l'AMH. L'AMH a été détectée dans environ 90% des cellules par immunocytochimie. De plus les CG en culture expriment des marqueurs spécifiques comme l'inhibine alpha (*inha*) ou le récepteur FSH (*fshr*) mais n'expriment pas le récepteur à la LH (*lhcg*), marqueur spécifique des cellules de la thèque à ce stade. La culture a donc été considérée comme quasiment pure, non contaminée par des cellules de la thèque. Pour tester l'efficacité de transfection, nous avons transfecté d'une part un plasmide codant pour la β -galactosidase et d'autre part un siRNA contrôle fluorescent (GAPDH-cy3). Nous avons pu constater qu'environ 20% des CG étaient positives après transfection du plasmide β -galactosidase et 97,5% des CG étaient transfectées par les siRNA. La culture de CG est donc facilement transfectable que ce soit avec un plasmide ou avec des siRNA. Enfin, les cellules ont été exposées à de l'AMH (8nM) pour vérifier l'augmentation de la phosphorylation des Smad1/5/8 intracellulaires par Western blot. La culture primaire de cellules de la granulosa maintient sa capacité à répondre à une exposition à l'AMH par la phosphorylation des Smads cytoplasmiques.

Les CG en culture primaire présentent toutes les caractéristiques nécessaires pour notre étude.

b L'expression du gène Id3 augmente dans les CG après une exposition à l'AMH

Pour valider certaines de nos expériences nous avons besoin d'identifier de nouveaux gènes cibles de l'AMH. En effet, deux gènes cibles de l'AMH sont connus dans les cellules de la granulosa de lapine et de truie : l'aromatase (*Cyp19a1*) et le récepteur à la LH (*lhcg*). Cependant, dans notre modèle, ces deux gènes ne sont pas détectables. L'AMH est connue pour réguler les gènes codant pour des enzymes de la stéroïdogénèse dans les cellules de

Sertoli et de Leydig. Nous avons donc étudié, dans les CG, la régulation de certains d'entre eux tel que les gènes *Star*, *Cyp11a1*, *hsdb3* et *hsdb17*. Après une exposition des CG à l'AMH, nous n'avons observé aucune variation d'expression pour les gènes testés. Enfin, nous avons testé des gènes cibles des BMPs. En effet, l'AMH et les BMPs partageant leur voie de signalisation, les gènes cibles des BMPs sont de bons candidats pour être également des gènes cibles de l'AMH. Nous avons analysé l'expression des gènes *Id1*, 2 et 3 (inhibitor of DNA binding). Ces 3 gènes sont régulés positivement par l'AMH mais seul *Id3* présente une augmentation significative de son expression en réponse à la stimulation hormonale. Nous avons donc utilisé ce gène pour analyser certaines de nos expériences.

c Voie de signalisation de l'AMH dans les CG

- **Récepteurs et corécepteurs**

L'AMH peut transduire ses effets via 3 récepteurs de type I : ActR-IA, BMPR-IA ou BMPR-IB. Pour définir le récepteur impliqué dans les CG, nous avons utilisé une technique de transfection de siRNA dirigés contre chacun des trois récepteurs. Nous avons pu montrer que seules les cellules transfectées avec le siRNA dirigé contre *Bmpr1a* perdaient leur capacité à répondre à l'AMH. En effet, l'AMH n'entraîne plus la phosphorylation des Smad1/5/8 effectrices et n'est plus capable d'induire l'augmentation de l'expression de son gène cible *Id3*. Pour valider cette première expérience, nous avons étudié les CG isolées de souris cKO pour *Acvr1* (codant pour ActR-IA) ou *Bmpr1a*. Ces CG ont été exposées à l'AMH et la capacité de réponse des cellules a été évaluée en regardant la phosphorylation des Smad1/5/8 en aval. Les CG isolées à partir de souris cKO pour *Bmpr1a* ne sont plus capables d'induire la phosphorylation des Smads en réponse à l'AMH. Ce résultat confirme celui obtenu après transfection des siRNA.

Actuellement, aucun corécepteur de l'AMH n'a été décrit. L'AMH partageant sa voie de signalisation avec les BMPs, nous avons testé certains corécepteurs des BMPs comme potentiels corécepteurs de l'AMH. Parmi les corécepteurs des BMPs, nous avons choisi d'étudier les Repulsive guidance molecule (RGMs) pour définir si elles pouvaient intervenir dans la signalisation de l'AMH. Parmi les trois RGMs existants (RGMa, b et c) seul RGMb est exprimé dans les CG. La transfection de siRNA dirigés contre *Rgmb* a permis de montrer que l'AMH pouvait toujours transduire ses effets après une diminution de l'expression du

gène *Rgmb* de 90%. Ce corécepteur bien qu'il puisse être potentiellement utilisé par l'AMH ne semble pas être essentiel dans la voie de signalisation de cette hormone.

- ***R-Smad cytoplasmiques***

L'AMH peut potentiellement induire le recrutement et la phosphorylation des Smads 1, 5 et 8 intracellulaires. La technique de gènes rapporteurs Smad/gal4-UAS/luciférase a permis d'identifier les protéines Smads importantes à la transduction du signal de l'AMH. Cette approche implique une protéine de fusion, Smad-Gal4 et la construction UAS-Luc. En présence d'AMH, la protéine de fusion Smad/Gal4 va être phosphorylée ce qui permet sa translocation dans le noyau. Les séquences UAS présentes au niveau du promoteur de la luciférase sont des séquences de fixation spécifique de l'élément Gal4. Une fois dans le noyau, la protéine de fusion Smad/Gal4 d'intérêt va pouvoir se fixer sur le promoteur et activer le gène rapporteur UAS-Luc. Nous avons vérifié indépendamment l'importance de chaque protéine de fusion Smad/Gal4 (Smad1/Gal4, Smad5/Gal4 ou Smad8/Gal4) pour établir laquelle a un rôle essentiel. Le taux d'activation est mesuré en lisant l'activité Luciférase. Seules les protéines de fusion Smad1/Gal4 et Smad5/Gal4 entraînent une augmentation de l'expression de la luciférase en réponse à une exposition à l'AMH. Cette technique a permis de démontrer l'importance des Smad1 et 5 dans la voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa.

1.4 Conclusion

Le but de cette étude était de définir les acteurs de la voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa murines. Nous avons pour cela utilisé une culture primaire de cellules de la granulosa isolées à partir d'ovaire de souris de trois semaines. Nous avons validé un nouveau gène cible de l'AMH dans ces cellules, le gène *Id3*, dont l'expression est augmentée en réponse à une exposition à l'AMH. De plus, l'utilisation de siRNA et l'analyse de souris cKO a permis de mettre en évidence le récepteur BMPR-IA comme étant essentiel à la transduction du signal de l'AMH dans les CG. Pour finir, il semble que les Smad1 et 5 soient recrutées et phosphorylées en réponse à une exposition à l'AMH.

2 Publication

Anti-Müllerian Hormone Recruits BMPR-IA in Immature Granulosa Cells

Lauriane Sèdes^{1,2*}, Arnaud Leclerc^{1,2}, Hadia Moindjie^{1,2}, Richard L. Cate^{1,2}, Jean-Yves Picard^{1,2}, Nathalie di Clemente^{1,2}, Soazik P. Jamin^{1,2*}

¹ Inserm U782, Clamart, France, ² Université Paris-Sud, UMR- S0782, Clamart, France

Abstract

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a member of the TGF- β superfamily secreted by the gonads of both sexes. This hormone is primarily known for its role in the regression of the Müllerian ducts in male fetuses. In females, AMH is expressed in granulosa cells of developing follicles. Like other members of the TGF- β superfamily, AMH transduces its signal through two transmembrane serine/threonine kinase receptors including a well characterized type II receptor, AMHR-II. The complete signalling pathway of AMH involving Smads proteins and the type I receptor is well known in the Müllerian duct and in Sertoli and Leydig cells but not in granulosa cells. In addition, few AMH target genes have been identified in these cells. Finally, while several co-receptors have been reported for members of the TGF- β superfamily, none have been described for AMH. Here, we have shown that none of the Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) co-receptors, Repulsive guidance molecules (RGMs), were essential for AMH signalling. We also demonstrated that the main Smad proteins used by AMH in granulosa cells were Smad 1 and Smad 5. Like for the other AMH target cells, the most important type I receptor for AMH in these cells was BMPR-IA. Finally, we have identified a new AMH target gene, *Id3*, which could be involved in the effects of AMH on the differentiation of granulosa cells and its other target cells.

Citation: Sèdes L, Leclerc A, Moindjie H, Cate RL, Picard J-Y, et al. (2013) Anti-Müllerian Hormone Recruits BMPR-IA in Immature Granulosa Cells. PLoS ONE 8(11): e81551. doi:10.1371/journal.pone.0081551

Editor: Reiner Albert Veitia, Institut Jacques Monod, France

Received: July 26, 2013; **Accepted:** October 23, 2013; **Published:** November 28, 2013

Copyright: © 2013 Sèdes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by INSERM, Université Paris-Sud XI and the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) (grant under reference [ANR-08-JCJC-0059] to Soazik P. Jamin). Lauriane Sèdes holds a PhD studentship from Université Paris-Sud XI. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: soazik.jamin@inserm.fr

† Current address: Inserm U1085-IRSET, Université de Rennes I, Rennes, France

Introduction

Anti-Müllerian hormone (AMH) also called Müllerian inhibiting substance (MIS) is a member of the TGF- β superfamily. AMH is well known for its role in Müllerian duct regression in male fetuses [1]. In female fetuses, the lack of AMH expression allows the development of the Müllerian ducts into oviduct, uterus, cervix and the upper part of the vagina. Postnatally, AMH is secreted by granulosa cells (GCs) of small growing follicles (preantral and small antral) [1]. In mice, AMH is a negative regulator of the primordial to primary follicle transition [2]. In addition it decreases FSH sensitivity of growing follicles [3]. In clinics, serum AMH is now widely used in oncology and gynecology. Indeed, it is a very useful diagnostic and prognostic tool, as an early indicator of relapse of ovarian GC tumors [4] and as a reliable marker of the ovarian follicular status. AMH assay is also an important tool to control ovarian hyperstimulation [5]. However, despite the increasing interest of ovarian AMH in clinics, little is known on its mechanism of action on GCs.

Members of the TGF- β family signal through a type II transmembrane serine/threonine kinase receptor which forms a complex with a type I serine/threonine kinase receptor [6]. The type II receptor phosphorylates serine and threonine residues of type I receptor. Once activated, the type I receptor phosphorylates the receptor-regulated Smads (R-Smad) which interact with a

common partner Smad4. The Smad complex accumulates into the nucleus and regulates target gene expression [7]. TGF- β and activins activate TbetRI and ActR-IB type I receptors and R-Smads 2 and 3, whereas Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) mediate their effects through ActR-IA, BMPR-IA and BMPR-IB type I receptors and R-Smads 1, 5 or 8. This canonical signalling pathway is regulated at different levels, in particular by co-receptors which amplify or antagonize TGF- β family members action.

AMH has a single specific type II receptor (AMHR-II, also known as MISRII) [8,9]. Indeed, *Amhr* and *Amhr2* inactivation causes the same phenotype in males [10], a complete retention of an ectopic female reproductive tract, indicating that the AMH type II receptor is the only type II receptor that transduces AMH signal [11]. Moreover, in human, mutations of *AMH* or *AMHR-II* are involved in Müllerian duct derivative persistence [12]. Regarding the other components of AMH signalling pathway, it was first shown in different cell lines of gonadal origin that AMH phosphorylates R-Smad 1/5/8, meaning that it uses ActR-IA, BMPR-IA or BMPR-IB type I receptors to transduce its effects [13]. Then the disruption of these type I receptors and R-Smads in mice led to the conclusion that BMPR-IA is the primary type I receptor required for Müllerian duct regression but that ActR-IA is capable of transducing the AMH signal in the absence of BMPR-IA, and that R-Smad 1/5/8 function redundantly [14–

16]. Similarly, in the immature Sertoli cell line SMAT-1, AMH mediates its signal through BMPR-IA and ActR-IA [17]. In contrast, the type I receptors and R-Smads involved in AMH effects on post-natal GCs remain unknown. In addition, to date, no co-receptor has been found for AMH. Because AMH share with BMPs its type I receptors and R-Smad proteins, it could have the same co-receptors, like the Repulsive Guidance Molecule (RGM) [18] which were first shown to induce axonal guidance during neurogenesis [19] and have three isoforms: RGMa, RGMb (Dragon) and RGMc (Hemojuvelin).

To date, only few AMH target genes have been identified. In males, AMH inhibits Sertoli and Leydig cells differentiation through repression of several steroidogenic proteins like P450scc (*Cyp11a1*), 3 β -HSD (*Hsd3b1*) or P450C17 (*Cyp17a1*) [17,20,21]. Little is known on the genes involved in the inhibitory effect of AMH on GCs differentiation, preventing the study of AMH mechanism of action on these cells. Aromatase (*Cyp19a1*) and LH receptor (*Lhcgr*) are down-regulated by AMH in rat and porcine GCs [22]. In human GCs, FSHR (*Fshr*) is also repressed by AMH [23] which could explain the inhibitory role of this hormone on follicles sensitivity to FSH. Because BMPs share their signalling pathway with AMH and regulate GCs differentiation, BMPs target genes involved in this process could also be modulated by AMH. This could be the case for the family of Inhibitor of differentiation/Deoxyribonucleic Acid-Binding (*Id*) genes which are BMP2 and BMP4 target genes in mice [24]. These genes have been shown recently to be related to the status of GC differentiation [25]. They lack a domain required for DNA binding and act as negative antagonists of bHLH transcription factors and gene expression in mammals [26].

In this study, we used primary GCs isolated from immature mice to identify target genes and co-receptors potentially implicated in AMH effects on GCs differentiation and to define the involvement of the different type I receptors and Smads proteins in this process. We also took advantage on conditional mutant mice for different actors of AMH signalling pathway to confirm our data. Our studies reveal that *Id3* is a new AMH target gene in GCs. In addition, this work indicates that BMPR-IA and Smad 1/5 are the main components of AMH signalling pathway in GCs.

Materials and Methods

Ethics Statement

Housing and care, method of euthanasia and experimental protocols were conducted in accordance with the recommendations of the French Accreditation of Laboratory Animal Care and in compliance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N°C92-023-01). All animal experiments were supervised by Dr. Soazik Jamin (agreement delivered by the French Ministry of Agriculture for animal experiment N°C92-299). Animals were sacrificed with CO₂. All efforts were made to minimize animal suffering.

Reagents

Recombinant human AMH was produced from the culture medium of Chinese hamster ovary (CHO) cells stably transfected with a human AMH cDNA, purified and cleaved by plasmin (plasmin-cleaved AMH or PC-AMH) as previously described [27]. PC-AMH subsequently called AMH was used at a concentration of 8 or 40 nM. BMP2 was a kind gift of Prof. Walter Sebald (University of Würzburg, Germany) and was used at a concentration of 10 nM [28]. TGF- β was purchased from R&D Systems

(Lille, France) and used at 1 nM. Smad1-Gal4, Smad5-Gal4, Smad8-Gal4 and Gal-Luc plasmids were kindly provided by Dr. Azeddine Atfi (Inserm UMR S938, Paris).

Mice

Immature female C57BL/6JRj mice (3 weeks old) were purchased at Elevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France).

Amhr2-cre [15], *Acrv1*^{+/-} [29], *Bmpr1a*^{+/-} [30], *Acrv1*^{fx/fx} [31], *Bmpr1a*^{fx/fx} [32] mice were maintained on a C57BL/6J; 129/SvEv mixed genetic background. *Amhr2-cre*; *Acrv1*^{+/-} or *Amhr2-cre*; *Bmpr1a*^{+/-} males were bred to *Acrv1*^{fx/fx} or *Bmpr1a*^{fx/fx} females to generate females that were conditionally null for *Acrv1* or *Bmpr1a* respectively (designated as *Acrv1* cKO and *Bmpr1a* cKO).

Mouse genotyping

Genomic DNA was extracted from tail biopsies using a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. The primers used to detect *Acrv1* and *Bmpr1a* alleles are listed Table S1. The amplification conditions were 95°C for 5 min, followed by 94°C for 45 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 45 s (35 cycles), with a final extension at 72°C for 10 min. The amplified PCR fragments were analysed on 2% agarose gels.

Primary cultures of mouse granulosa cells

The preparation of mouse GCs primary cultures was adapted from a rat primary GC culture protocol [33]. Immature ovaries from 3 weeks old mice were collected in RPMI medium (Invitrogen). Then, they were exposed to 6.8 mM EGTA, 0.2% BSA in Medium 199 (Invitrogen) for 15 min at 37°C. After a 5 min centrifugation at 500 rpm, ovaries were placed in a hypertonic solution (0.5 M sucrose, 1.8 mM EGTA, 0.2% BSA) in Medium 199 for 5 min at 37°C. Three volumes of Medium 199 were added to stop the reaction. After a 5 min centrifugation at 500 rpm, ovaries were placed in DMEM/F-12 medium with 1% Fetal Bovine Serum (FBS, Life technologies) and GCs were dissociated with a blunt spatula. Cells were pelleted by a 10 min centrifugation at 1300 rpm. Supernatant was discarded and cells were resuspended in DMEM/F-12 without phenol red, 10% FBS. The collected cells were counted in the presence of Trypan blue (0.07%) and seeded in DMEM/F-12 without phenol red, 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Eurobio, Courtaboeuf, France) at 37°C in 5% CO₂. 36 h after plating, GCs were exposed to AMH, BMP2 or TGF- β in DMEM/F-12 without phenol red, 1% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Eurobio) for 24 h for RNA analyses. For protein analyses, GCs were starved in serum-free medium for 1 h prior to a 3 h AMH, BMP2 or TGF- β exposure.

β -galactosidase and pmaxGFP transfection

Primary GCs seeded in 6-well plates (5 \times 10⁵ cells/well) were transfected using Eugene6 reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France) with 1 μ g β -galactosidase reporter gene or pmaxGFP vector when cells were 80% confluent. After 24 h, β -galactosidase activity was detected with X-gal staining and GFP signal was directly visualized.

Immunofluorescence

Cells were seeded in 4-well Lab-Tek (1 \times 10⁵ cells/well) (Dutscher, Brumath, France) and incubated at 37°C in 5% CO₂. After a quick wash in 1X phosphate-buffered saline (PBS), the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min. After a permeabilization step in tris-buffered saline (TBS)/0.2%

Triton, cells were incubated in blocking buffer (PBS 1X, 10% BSA, 0.3% Triton) for 1 h at room temperature. Then cells were incubated with the anti-AMH (1:500, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) primary antibody in dilution buffer (PBS 1X, 1% BSA, 0.3% Triton) overnight at 4°C. After one wash in TBS/Triton, cells were incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor-488 conjugated rabbit antibody) 1 h at room temperature in the dark. Cells were washed in high salt PBS and slides were covered with mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories, Abcys, Les Ulis, France).

Immunohistochemistry

Ovaries from 3 weeks old C57BL/6J females were collected and fixed in 4% PFA for 4 h at 4°C. Samples were then washed with PBS (pH 7.4), dehydrated in graded ethanol, embedded in paraffin and cut into 5 µm thick sections. For antigen retrieval, samples were boiled in citrate buffer 10 mM pH 6.0 at 80°C for 45 min. Thereafter, slides were washed with PBS and blocked with PBS-BSA 10% for 1 h before an overnight incubation with a primary anti-RGMb antibody (1:100 in DAKO buffer, Santa Cruz). Specimens were washed with PBS and incubated with a secondary biotinylated antibody (anti-rabbit 1:500) 1 h at room temperature. After washing, slides were incubated 1 h in ABC reagent (ABC kit, Vectastain, Abcys) and stained with DAB reagent during 5 min.

siRNA gene knockdown

Small-interfering RNAs (siRNAs) for *Acrv1* (59932), *Bmpr1a* (160872), *Bmpr1b* (60258), and a negative control siRNA #1 were obtained from Ambion (Life Technologies) and siRNA *Rgmb* (J05553408) was obtained from Dharmacon (Fisher Scientific, Illkirch, France). siRNAs were used at a final concentration of 100 nM. Primary GCs seeded in 6-well plates (5×10^5 cells/well) were transfected using Oligofectamine reagent (Life Technologies) with 100 nM siRNA when cells were 50% to 80% confluent. The medium was removed after 3 h and replaced by DMEM/F-12 1% FBS. The cells were then cultured 3 h or 24 h in the presence of 8 nM AMH.

siRNA GAPDH-cy3 (4390849, Life Technologies) used to show transfection efficiency was transfected as described above and the fluorescence was analysed by flow cytometry (FACS Calibur, Becton Dickinson).

Luciferase Assay

Primary GCs seeded in 6-well plates (5×10^5 cells/well) were co-transfected with a luciferase reporter (UAS-luc, 300 ng), expression construct (Smad-Gal4, 200 ng) [34] and pRLTK (1 ng, Promega) as a control for transfection efficiency. Transfection was performed using FugeneHD according to the manufacturer's instructions (Roche). Cells were subsequently treated 24 h with AMH (8 nM), washed with PBS and lysed in passive lysis buffer (Promega). All lysates were analysed for Firefly and Renilla luciferase activity according to the manufacturer (Dual Luciferase kit, Promega). Results were expressed as a percentage of stimulation of Firefly luciferase activity (after normalization to Renilla luciferase activity) in the presence of AMH compared to cells cultured in control medium.

RNA isolation and Reverse Transcription

Total RNAs were isolated using the RNeasy Minikit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed in a total of 20 µl with the Omniscript Reverse Transcription Kit for RT-PCR (QIAGEN) using 500 ng or 1 µg

total RNA, Omniscript reverse transcriptase, oligo-dT primers (1 µM) and random hexamers (10 µM) as recommended by the manufacturer. The samples were incubated 1 h at 37°C.

PCR amplification

cDNA from primary GCs or total ovary were used to amplify *Inha*, *Lhcgr*, and *Fshr* by PCR. The primer pairs used are shown Table S2. PCR was performed using PCR mix (Qiagen). The amplification conditions were 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 58°C for 45 s, and 72°C for 45 s, with a final extension at 72°C for 10 min. The amplified PCR fragments were analysed on 2% agarose gels.

Quantitative real-time PCR

Quantification of the content of *Amhr2*, *Acrv1*, *Bmpr1a*, *Bmpr1b*, *Cyp11a1*, *Fshr*, *Id3*, *Inha*, *Rgma*, *Rgmb*, *Rgmc*, *Smad1*, *Smad4*, *Smad5*, *Smad8*, *Star* and *Hprt* mRNA was performed by real-time PCR using the TaqMan PCR method. The primers and the UPL probes (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) used to amplify these genes are indicated Table S2. Real-time PCR was performed with one fifth dilution of the cDNAs using the Lightcycler 480 Probes Master kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Primers were used at a concentration of 5 µM and probes at 1 µM. The PCR protocol used an initial denaturing step at 95°C for 10 min followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 58°C for 30 s, 72°C for 1 s. To generate standard curves, different concentrations of the purified and quantified PCR products were amplified. Relative gene expression was normalized to an endogenous control gene (*Hprt*).

Western blot

Mouse primary GCs were seeded into 6 wells plates at a density of 5×10^5 cells/well in 2ml of culture medium. Cells were then harvested, and lysed in 50 mM Tris HCL (pH 7.4)/150 mM NaCl, 1% protease inhibiting cocktail and 1% Triton. Insoluble material was removed by centrifugation at 12,000×g, for 5 min at 4°C. The supernatants were recovered, and protein concentrations were measured using the BCA protein assay kit (Pierce). Equivalent amounts of protein lysates (8 to 20 µg) were subjected to 4–20% SDS-PAGE (Biorad) and electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes. After the blocking of non-specific binding sites for 1 h in Tris-buffered saline (25 mM Tris and 150 mM NaCl, pH 7.6) containing 5% non-fat milk and 0.1% Tween 20, the membranes were exposed to the primary antibodies (anti-phospho-Smad 1/5/8 and anti-phospho-Smad2/3 (Cell Signalling Technology) both at 1:500) overnight at 4°C. Reactive proteins were detected with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000) for 1 h at room temperature and developed with West Pico Western blotting detection reagents (Pierce). The membranes were stripped with a stripping buffer (Pierce), then reprobed with a mouse monoclonal antibody to β-Actin (Sigma Aldrich) or mouse monoclonal anti-α-Tubulin (Sigma Aldrich). Western blots were quantified using ImageJ software.

Statistical analysis

All experimental data are presented as means ± SEM. Data were analyzed using *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey test for all-pair comparisons to compare respectively two or several means. A difference was considered statistically significant when the *p*-value was <0.05. * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001. All calculations were made using GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

Primary cultures of immature mouse granulosa cells

To identify the different components of the AMH signalling pathway in GCs, we first isolated immature GCs from 3 weeks old mice [33] and we characterized them for different criteria. Immature ovaries are mainly composed of small growing follicles whose GCs express AMH [35]. Therefore, we used an AMH antibody coupled to an Alexa fluor-488 secondary antibody to evaluate the purity of the primary GCs by immunofluorescence (Fig. 1A and 1B). About 90% of the cells expressed AMH which indicated an efficient enrichment of GCs (Fig. 1A and 1B). Since we had to transfect plasmid DNA in GCs, we then assayed transfection efficiency in these cells using a β -galactosidase reporter gene (Fig. 1C) or pMax-GFP vector (Fig. 1D). After X-Gal staining, we found that about 20% of the cells stained positively for β -galactosidase activity, indicating that they had been properly transfected (Fig. 1C). The transfection capacity of the primary GC culture was confirmed with pMax-GFP transfection by visualizing GFP-expressing cells (Fig. 1D). We also checked siRNA transfection efficiency. GCs were transfected with a fluorescently-labelled control siRNA (GAPDH-cy3 siRNA). The next day, the cells were trypsinized and the cell suspension was analysed by flow cytometry. We found that 97.5% of the GCs were transfected with the fluorescent siRNA, demonstrating a high siRNA transfection efficiency (Fig. 1E). We then checked for the presence of GCs markers (Fig. 1F). As in the total ovary, GCs expressed FSH receptor (*Fshr*) and α inhibin (*Inha*) (Fig. 1F). On the other hand, LH receptor (*Lhcgr*), a theca cell marker at this stage, was detected in the 3 weeks old ovary, as expected, but absent in the GCs. These results confirmed that the culture was at least 90% pure with little or no theca cell contamination.

Granulosa cells can respond to plasmin cleaved AMH

We next studied the expression of the different components of AMH signalling pathway in GCs. Using real time PCR, we observed that all of the serine/threonine kinase receptors candidate genes (*Acrv1*, *Bmpr1a*, *Bmpr1b* and *Amhr2*) (Fig. 2A) and the three candidate *Smads* (Fig. 2B) were expressed in primary GCs. The results showed that *Amhr2* was expressed at higher levels (between 3.5 and 37 times) than the type I receptors (Fig. 2A), *Bmpr1a* being the most represented (Fig. 2A). Among *Smads*, *Smad4* was the most expressed, the levels of *Smad1* and *Smad5* were similar and *Smad8* protein was poorly represented (Fig. 2B). We then tested if primary GCs were responsive to AMH (plasmin-cleaved AMH). We analysed the response of GCs after a 3 h exposure to AMH by Western blot using a phospho-Smad 1/5/8 antibody (Fig. 2C). Both AMH and BMP2, which is the primary inducer, could increase phospho-Smad 1/5/8 levels (Fig. 2C and 2D) while TGF- β had no effect on this pathway. We then checked if AMH could also activate the alternative Smad2/3 pathway. TGF- β which is a primary inducer of the Smad 2/3 pathway was used as a positive control in parallel with AMH (Fig. 2E). As expected, in the presence of TGF- β , phospho-Smad 2/3 levels were increased in primary GCs (Fig. 2E and 2F). However, neither AMH nor BMP2 were able to activate the Smad2/3 pathway (Fig. 2E and 2F). Thus, the primary GCs displayed all the characteristics necessary for our study. They expressed all of the factors of the AMH signalling pathway, they were properly transfected and they were sensitive to AMH. These primary GCs were then used for the rest of the studies described in this paper.

AMH target genes in granulosa cells

To monitor AMH signalling, we then screened for downstream target genes. GCs were treated with AMH (8 nM) during 24 h, and the expression of candidate genes was analysed by real time PCR. We first tested AMH target genes previously identified in the ovary. Aromatase (*Cyp19a1*) and LH receptor (*Lhcgr*) were expressed at very low levels and we were not able to detect any variation of their expression after AMH exposure (data not shown). We then studied α inhibin (*Inha*) (Fig. 3A) and FSH receptor (*Fshr*) (Fig. 3B) whose expression was not modulated by AMH in GCs. Because AMH regulates genes encoding steroidogenic enzymes in Sertoli and Leydig cells, we tested whether their expression was also affected by AMH in GCs. 3 β -HSD (*Hsd3b1*) expression was too low to detect any variation (data not shown). *Star* (Fig. 3C) and P450scc (*Cyp11a1*) (Fig. 3D) were not regulated by AMH. Finally, we tested the effect of AMH on *Id* genes expression which are known to be up regulated by BMPs. *Id1*, 2 and 3 were up-regulated by BMP2 in GCs but not by TGF- β (data not shown). Similarly to BMP2, AMH increased all *Id* genes expression but only *Id3* gene was significantly up-regulated (Fig. 3E). After 24 h in the presence of AMH, *Id3* expression in GCs is increased by 50%. Therefore, *Id3* gene was used in this study to assay siRNA knockdown experiments.

Involvement of the different serine/threonine kinase receptors in AMH signalling

To determine which type I serine/threonine kinase receptor(s) was important for AMH signalling pathway, we used siRNA for gene knockdown (Fig. 4). Primary GCs were isolated from immature ovaries and transfected when 50 to 80% confluence was reached with different siRNAs against *Acrv1*, *Bmpr1a* and *Bmpr1b*. After another 24 h of culture, the cells were exposed to AMH and total RNA were extracted 24 h later. We first checked the expression of each serine/threonine kinase type I receptor gene after siRNA transfection using real time PCR (Fig. 4A–C). For each type I receptor gene, we tested three different siRNAs (data not shown) and selected the most efficient one for the rest of the study. siRNA transfection led to a 80% decrease of *Acrv1* mRNA levels (Fig. 4A), a 70% decrease for *Bmpr1a* (Fig. 4B) and a 70% decrease for *Bmpr1b* (Fig. 4C). Since the down regulation was significant for each of the genes, we then analysed the responsiveness of these knocked-down GCs to AMH by Western blot with a phospho-Smad1/5/8 antibody (Fig. 4D). In parallel, the GCs were transfected with a negative control siRNA which does not interfere with any of the targeted RNAs. As expected, the negative control siRNA had no effect since the transfected cells could respond to AMH through the activation of the Smad1 pathway (Fig. 4D and 4E). Similarly, the *Acrv1* and *Bmpr1b* knockdown cells were sensitive to AMH. However, the effect was not significant for *Acrv1* because of the large standard deviation. On the other hand, in presence of siRNA against *Bmpr1a*, the effect of AMH on phospho-Smad1/5/8 levels was reduced significantly compared to GC transfected with the control siRNA. This result indicates that BMPR-IA is important for AMH signalling in GCs (Fig. 4D and 4E). We then analysed the effect of AMH on *Id3* expression in GCs transfected with the different siRNAs (Fig. 4F). *Id3* expression was up-regulated by 83% after AMH exposure in GCs transfected with control siRNA. *Id3* was also up-regulated by 158% in GCs transfected with siRNA against *Acrv1* and by 76% in GCs transfected with *Bmpr1b* siRNA. In contrast, in GCs transfected with siRNA against *Bmpr1a*, AMH was unable to up-regulate the expression of *Id3*. siRNA technology allowed us to show that BMPR-IA is important to transduce AMH signal in GCs (Fig. 4D, 4E and 4F).

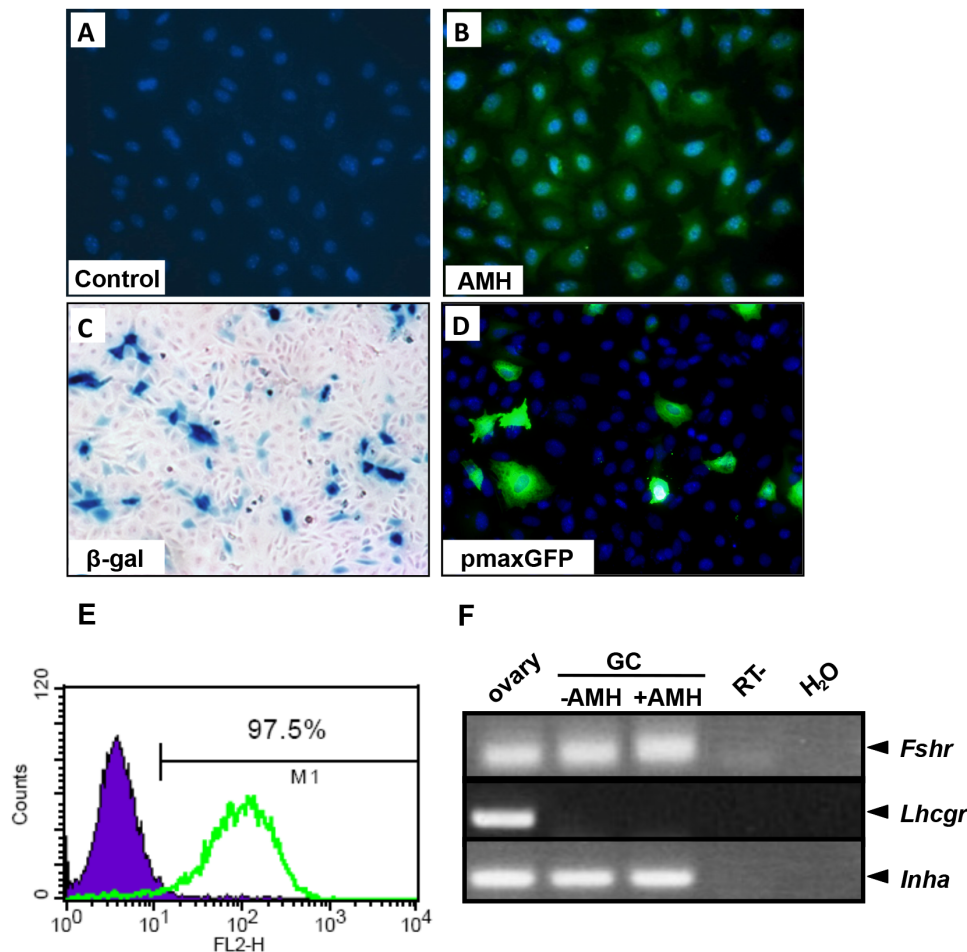


Figure 1. Characterization of granulosa cells in primary culture. Granulosa cells (GCs) were collected from 3 weeks old C57BL/6 mice ovaries and seeded at a density 1×10^5 cells/well. 24 h later, GCs were incubated without primary antibodies (IgG) for the control condition (A) or with an anti-AMH antibody (B). The secondary antibody was coupled to FITC and DAPI was used to visualize the nucleus. AMH expression was detected in the cytoplasm as expected. To assay the transfection efficiency, primary GCs were transfected either with a β -galactosidase vector (C, 1 μ g), pMax-GFP vector (D, 1 μ g) or GAPDH-cy3 siRNA (E). After 24 h, GC were fixed, stained with X-Gal and counterstained with nuclear fast red (C) or fluorescence was visualized (D). Alternatively, siRNA transfection efficiency was assayed with a GAPDH-cy3 siRNA on isolated GCs using flow cytometry analysis (E). (F), Markers of immature GCs were analysed by RT-PCR to confirm their status.
doi:10.1371/journal.pone.0081551.g001

Granulosa cells from *Bmpr1a* cKO mice no longer transduce AMH signalling

To confirm the siRNA results, we generated *Acvr1* and *Bmpr1a* conditional knockout (cKO) mice, using *Amhr2-cre* line to delete these genes in GCs. *Amhr2^{+/cre}; Acvr1^{+/-}* or *Amhr2^{+/cre}; Bmpr1a^{+/-}* males were bred to *Acvr1^{flx/flx}* or *Bmpr1a^{flx/flx}* females to generate females that were conditionally null either for *Acvr1* or *Bmpr1a* in GCs. *Amhr2^{+/cre}; Acvr1^{flx/-}* and *Amhr2^{+/cre}; Bmpr1a^{flx/-}* are designated *Acvr1* cKO and *Bmpr1a* cKO, respectively. GCs were isolated from these cKO mice ovaries and we tested the response of these cells to AMH by Western blot using a phospho-Smad 1/5/8 antibody. GCs from *Acvr1* cKO mice were as sensitive to AMH as GCs from control mice (Fig. 5A and 5B). In contrast, GCs from *Bmpr1a* cKO mice had lost their capacity to respond to AMH (Fig. 5C and 5D). The effect of AMH on phospho-Smad1/5/8 level was reduced significantly in GCs from *Bmpr1a* cKO compared to WT GCs (Fig. 5D). These results were consistent with the siRNA experiments and indicated that BMPR-IA was essential for AMH signalling in GCs.

RGMb is not required for AMH signalling in granulosa cells

We then tested whether the BMP co-receptors RGMs could also be AMH co-receptors. We analysed the expression of *Rgma*, *Rgmb* and *Rgmc* in the ovary and primary GCs by RT-PCR (Fig. 6A) and q-PCR (Fig. 6B). *Rgma* and *Rgmc* expression was detected in total ovary but not in GCs (Fig. 6A and 6B). In GCs, we only detected *Rgmb* (Dragon) (Fig. 6A and 6B). In parallel, we confirmed the localization of RGMb in the ovary by immunohistochemistry where it is mainly present in GCs (Fig. 6C). To determine the potential role of RGMb in these cells, we transfected them with a siRNA directed against this co-receptor. We first checked whether this gene was down-regulated by q-PCR (Fig. 6D) and then analysed the sensitivity of these cells to AMH by Western blot using a phospho-Smad 1/5/8 antibody (Fig. 6E). siRNA transfection led to a 90% decrease of *Rgmb* mRNAs (Fig. 6D). The *Rgmb* knockdown GCs were as sensitive to AMH as control GCs (Fig. 6E and 6F). We then analysed the effect of AMH on *Id3* expression in GCs transfected with siRNA against *Rgmb* (Fig. 6G). AMH stimulation led to a 60% increased in *Id3* expression in GCs

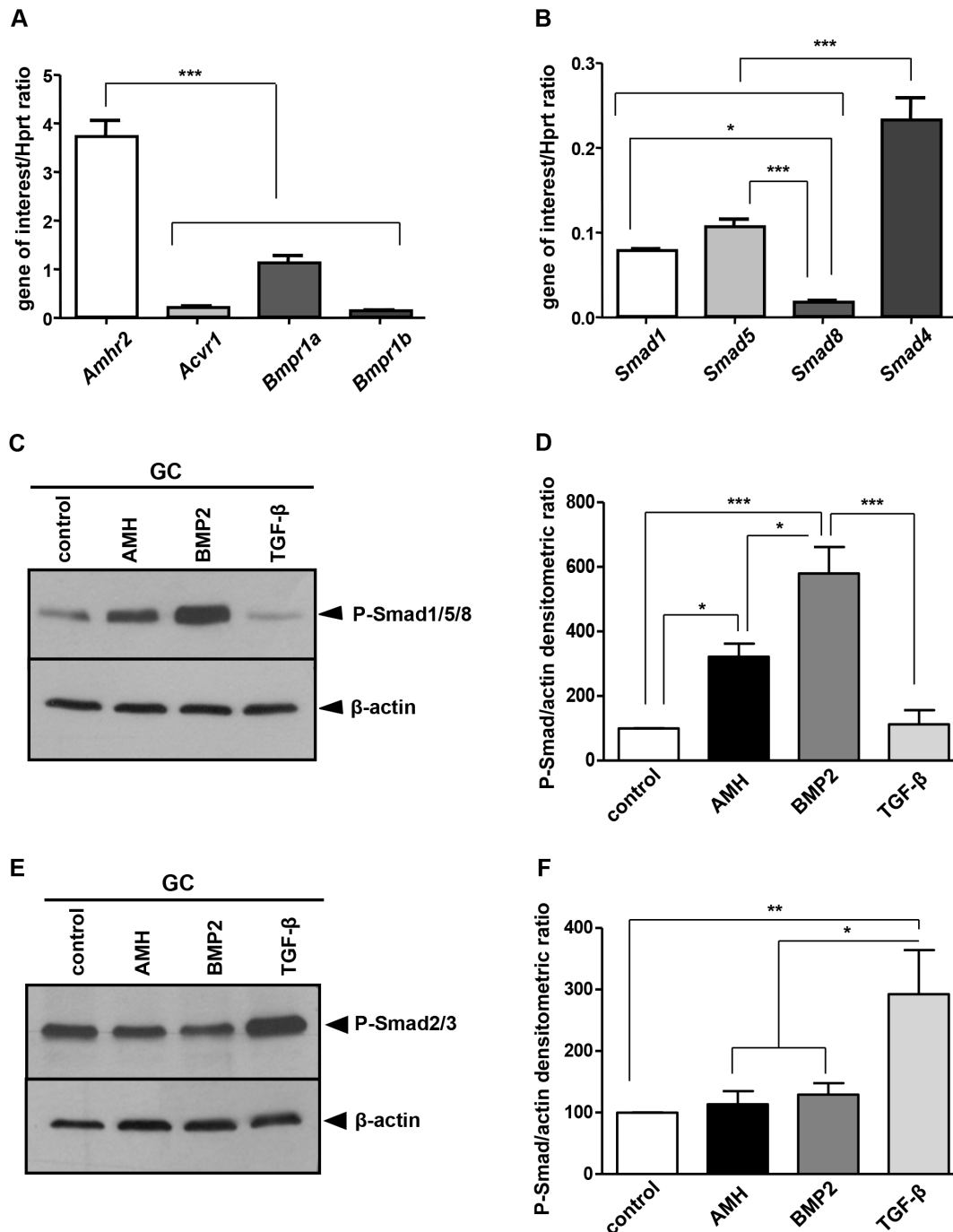


Figure 2. AMH activates Smad1 pathway in granulosa cells. GCs were isolated from 3 weeks old mice ovaries and seeded at 5×10^5 cells/well in 6 wells plates. RNA was extracted to test AMH signalling pathway actors expression. The main known actors were analysed by real time PCR, including AMH type II and type I receptors (A, $n = 6$) and Smads proteins (B, $n = 6$). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test for all-pair comparisons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. GCs were exposed or not to 8 nM AMH, 10 nM BMP2 and 1 nM TGF- β . Proteins were extracted and analysed by Western blot using a phospho-Smad1/5/8 antibody (C, $n = 4$) or a phospho-Smad2/3 antibody (E, $n = 4$). Western blots were quantified and normalized to actin levels (D, F, $n = 4$). AMH could only activate the Smad1/5/8 pathway in GCs (C, D) but not the Smad2/3 one's (E, F). As controls, BMP2 only phosphorylated the Smad1/5/8 proteins (C, D) while TGF- β activated exclusively the Smad2/3 pathway (E, F). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test for all-pair comparisons. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$
doi:10.1371/journal.pone.0081551.g002

either transfected with control siRNA or not transfected. *Id3* also remained up-regulated by AMH at the same level in GCs transfected with siRNA against *Rgmb*. Altogether, these results showed that AMH can transduce its signal in the absence of

RGMB indicating that this co-receptor was not essential for AMH signalling pathway in GCs.

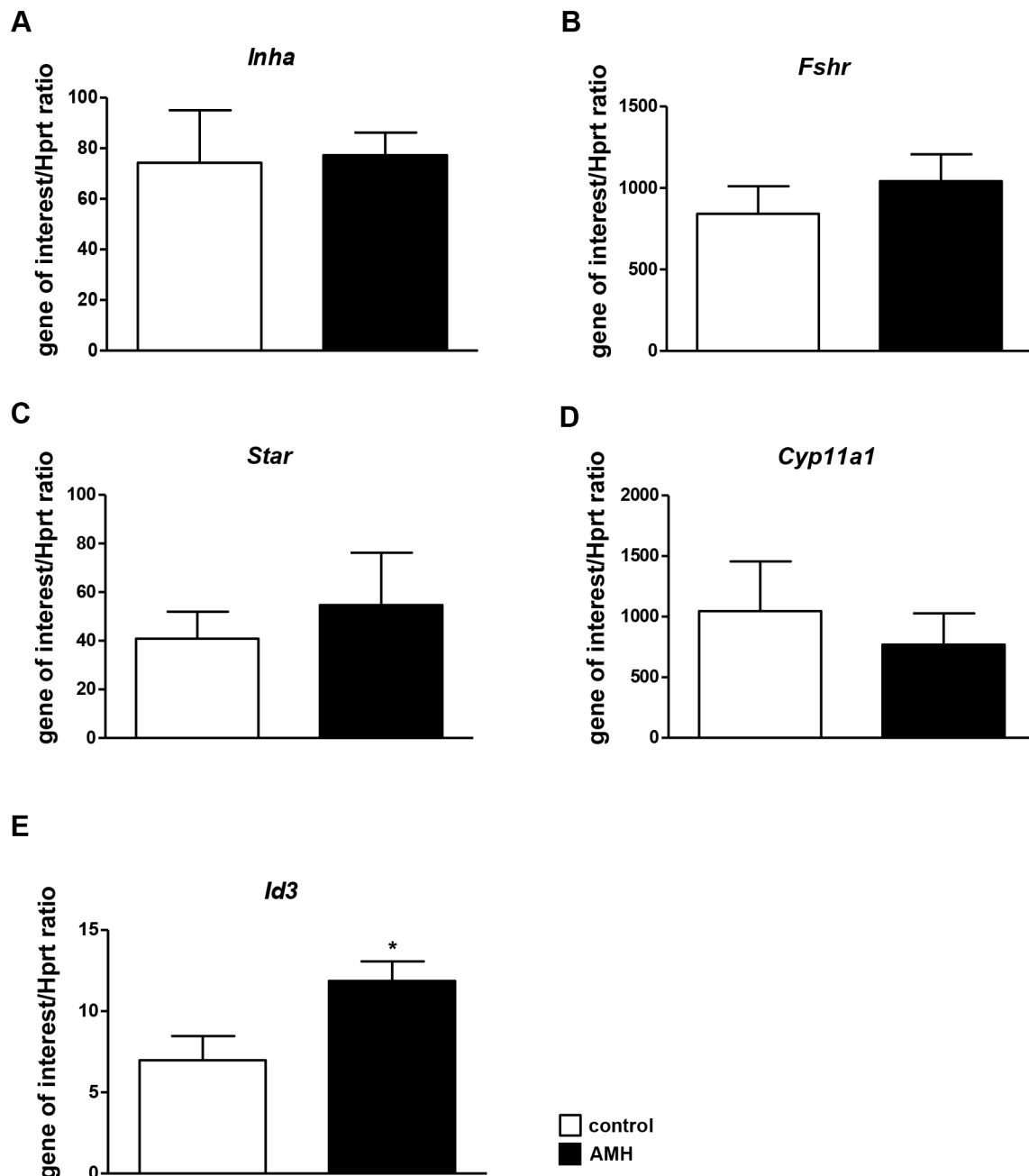


Figure 3. AMH target genes in granulosa cells. After collecting and seeding, GCs were exposed (■) or not (□) to 8 nM AMH (A–E) for 24 h. The effect of AMH stimulation on different potential target genes was examined by real time PCR (A–D, n = 4; E, n = 5). Hprt expression was used to normalize the results. Data were analyzed using paired *t*-test. * $p < 0.05$. *Id3* expression is significantly increased after AMH exposure. doi:10.1371/journal.pone.0081551.g003

Smad1 and 5 are the main Smads used by AMH in GCs

To investigate which Smad was important for AMH signalling in GCs, we first used siRNA for gene knockdown but we were not able to decrease Smad expression more than 50% (data not shown). We then used a reporter gene assay. 24 h after the preparation of GCs they were transfected with two plasmids: an expression plasmid which encodes a fusion protein (Smad1-Gal4-DBD/Smad5-Gal4-DBD or Smad8-Gal4-DBD) and a reporter plasmid which codes for a luciferase gene placed under the control of a promoter which contains UAS sequences (UAS-luc). These sequences are known to specifically bind Gal4 [36]. 24 h after

transfection, the cells were treated during another 24 h with AMH (8 nM) and luciferase activity was measured (Fig. 7). As a control, we transfected Gal4-DBD with the reporter plasmid. As shown on Figure 7, AMH significantly increased Smad1 and Smad5 activity (110% and 80%, respectively) while it had no effect on Smad8. These results indicated that Smad1 and Smad5 were equally important for AMH signalling in GCs.

Discussion

The aim of this study was to define the different actors of AMH signalling pathway including new target genes in immature GCs.

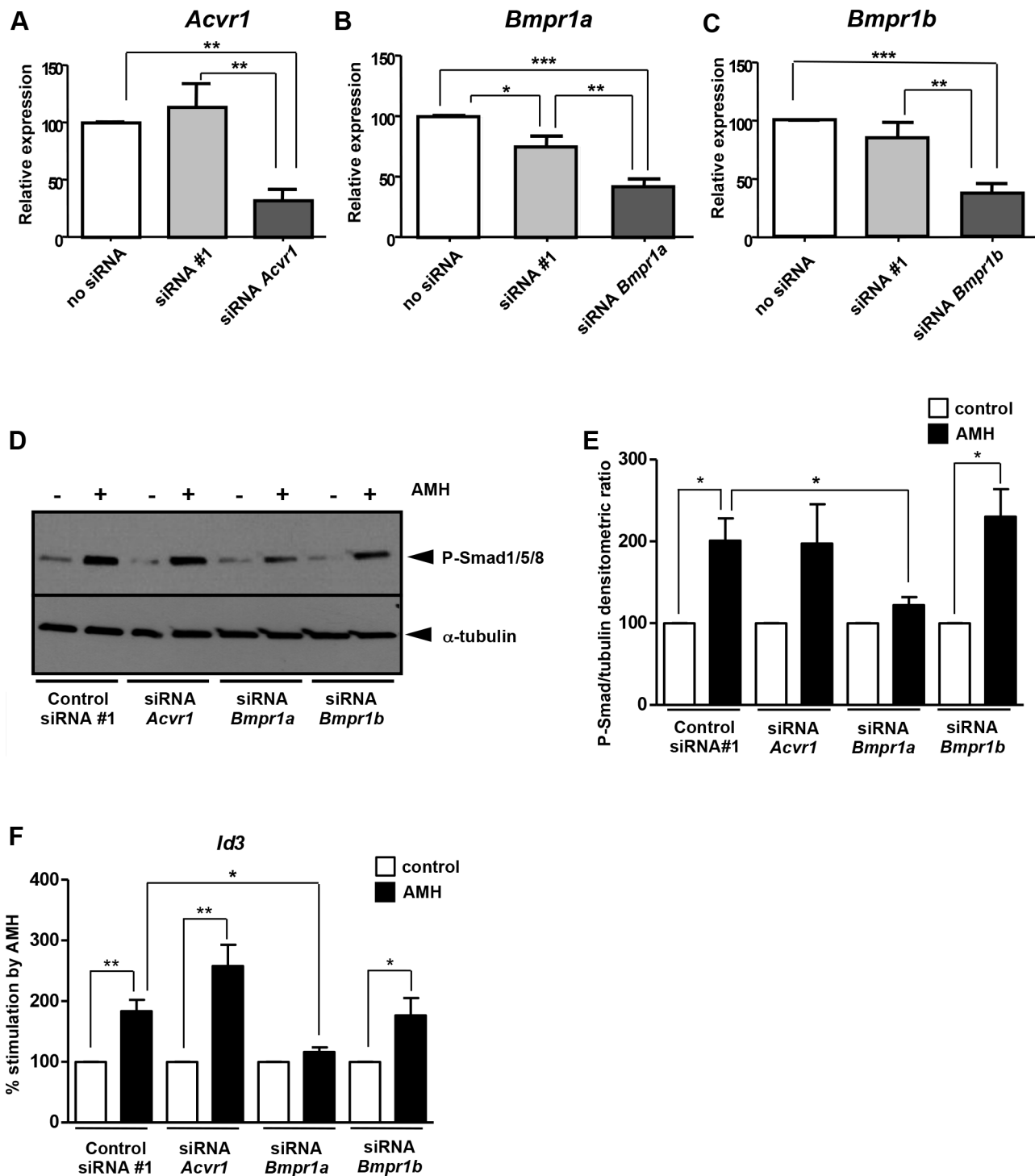


Figure 4. Involvement of serine/threonine kinase type I receptors. siRNA transfection for each type I receptor gene was performed when cells were 50% to 80% confluent. 24 h later GCs were exposed (■) or not (□) to 8 nM AMH during another 24 h. The effect of siRNA on target gene expression was determined by real time PCR (A–C, $n = 4$). Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey test for all-pair comparisons. The effect of *Acvr1*, *Bmpr1a* and *Bmpr1b* knockdown on AMH sensitivity was analysed by Western blot using a phospho-Smad1/5/8 antibody (D, $n = 4$) and was quantified and normalized (E). The effect of *Acvr1*, *Bmpr1a* and *Bmpr1b* knockdown on *Id3* expression was analyzed by real-time PCR (F, $n = 3$). Data were analyzed using paired *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Only GCs transfected with siRNA against *Bmpr1a* present a significant decrease of AMH response.

doi:10.1371/journal.pone.0081551.g004

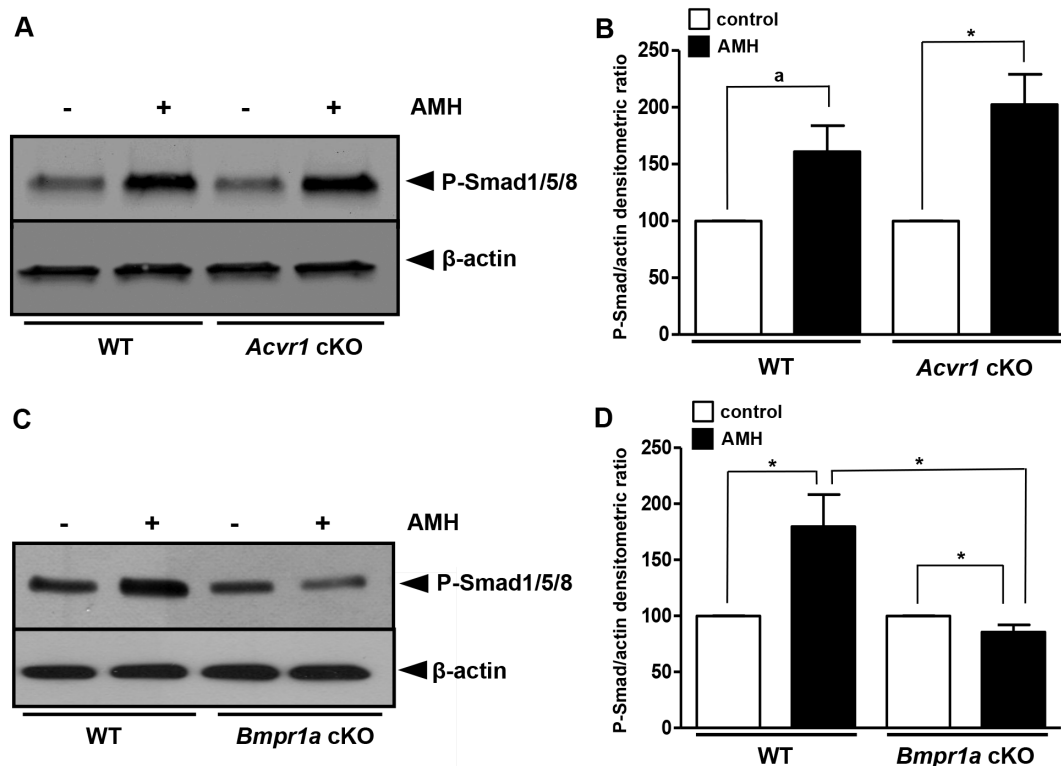


Figure 5. Granulosa cells from *Bmpr1a* cKO mice do not respond to AMH. *Amhr2-Cre; Acvr1^{+/+}* or *Amhr2-Cre; Bmpr1a^{+/+}* males were bred to *Acvr1^{fx/fx}* or *Bmpr1a^{fx/fx}* females to generate females that were conditionally null for *Acvr1* (A, n = 3) or *Bmpr1a* (B, n = 7) in GCs. GCs were exposed (■) or not (□) to 8 nM AMH. The AMH response was tested in GCs from these cKO mice by Western blot using a phospho-Smad1/5/8 antibody (A,C). Western blots were quantified and normalized to actin levels (B n = 3, D n = 7). AMH induced the phosphorylation of Smad1/5/8 in GCs from *Acvr1* cKO (A, B) mice but not in those from *Bmpr1a* cKO mice (C, D). Data were analyzed using paired t-test. * $p < 0.05$, a: $p = 0.058$. Only *Bmpr1a* conditional mutant GCs present a significant decrease of AMH response.
doi:10.1371/journal.pone.0081551.g005

We report that AMH up-regulates *Id3*, through BMPR-IA and that only Smad 1/5 are activated by AMH in these cells. We used in this study primary culture of mouse GCs and when available, we checked our results on GCs from conditional knockout mice for type I receptors.

GCs were prepared from 3 weeks old mouse immature ovaries. At this stage, ovaries are mainly composed of growing follicles expressing AMH and very few theca cells [22,33]. As expected, immunocytochemistry showed that more than 90% of the cells express AMH, indicating that the culture predominantly contains GCs. Furthermore, these cultures expressed *Fshr* and *Inha* but not *Lhcg*, a theca cell marker at this stage. The expression of *Fshr* is compatible with the presence of antral follicles at 3 weeks and with the fact that *Fshr* is detectable before the follicles become sensitive to FSH. These GCs were also properly transfected by siRNAs or plasmids allowing quantitative studies of the AMH signalling pathway. Finally, they expressed *Amhr2*, the AMH specific type II receptor, the three type I receptors and the R-Smads (Smad1 pathway) necessary to respond to AMH [37]. In keeping with this result, GCs in primary culture maintained their ability to respond to AMH by activating the Smad1 pathway.

We also addressed whether a new family of BMP co-receptors [18] the RGMs, RGMa, b (DRAGON) and c (Hemojuvelin), were expressed by GCs and could be AMH co-receptors. This hypothesis was based on the fact that BMPs and AMH share their signalling pathways, and that both RGMs and AMH are involved in anti-proliferative effects [38–43]. Indeed, *Rgmb* knockdown results in enhanced proliferation, adhesion, and

migration in breast cancer cells [42] and in increased migration and invasion in PC-3 cells [43]. On the other hand, AMH has been described as a tumor suppressor gene in the mouse testis [41]. Moreover, *in vitro* studies have shown that AMH inhibits the growth of ovarian, endometrial and breast cancer cell lines [38–40]. We report that RGMb is the only RGM expressed in GCs but that the decrease of its expression using siRNA does not alter AMH responsiveness, indicating that RGMb is not essential for AMH signalling in GCs. Unfortunately, *Rgmb* knockout mice die within 2 to 3 weeks after birth suffering from immune and inflammatory disorders, precluding the study of the female reproductive tract [44].

We had previously shown in the adult mouse GC line AT29C-U493 that AMH activated the Smad1/5/8 signalling pathway [45]. Here we seek to identify which one of these Smad was preferentially phosphorylated and activated by AMH in GCs. We demonstrated, using reporter genes specific for each Smad, that only Smad1 and 5 are activated by AMH. Our results are in agreement with the phenotype of the transgenic models for Smad1/5/8. Indeed *Smad8* knockout mice are viable and fertile [46–48] and *Smad8* is the least expressed Smad in GCs indicating that this Smad is not important for ovarian physiology. In contrast, Smad1 and Smad5 function together in the ovary to suppress ovarian tumorigenesis [49]. Regarding the involvement of Smad proteins in AMH signalling, partial retention of Müllerian ducts is observed when *Smad5* is inactivated with or without another *Smad*, suggesting that *Smad5* is the most important Smad required for Müllerian ducts regression [16]. However, complete Müllerian

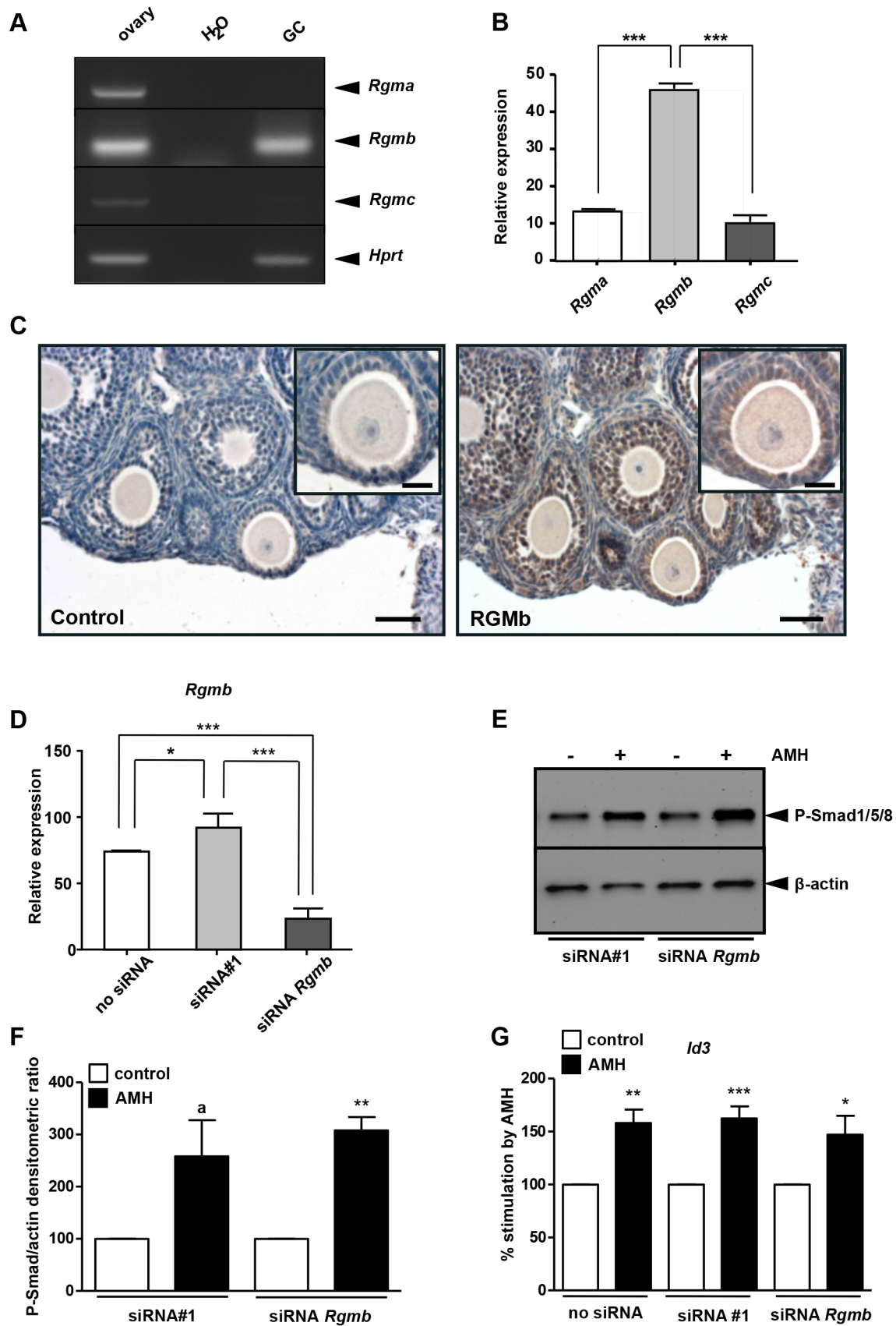


Figure 6. RGMB is not essential for AMH signalling in granulosa cells. *Rgma*, *b* and *c* expression was analysed by RT-PCR (A) or real time PCR (B, $n=6$). (A) RT-PCR showed that all three *Rgm* were expressed in the mouse immature ovary (left lane) while *Rgmb* seemed predominantly expressed in GCs (right lane) (A). Real-time PCR confirmed that *Rgmb* was more expressed than *Rgma* and *Rgmc* in GCs (B). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey test for all-pair comparisons. Mouse immature ovary was subjected to immunohistochemistry using an RGMB antibody (C). The left panel was the control without the primary antibody. The right panel shows that RGMB is expressed in the cytoplasm of granulosa cells (scale bar = 50 μ m; insert, scale bar = 20 μ m). siRNA transfection targeting *Rgmb* was performed when cells were 50% to 80% confluent (D–G). GCs were exposed (■) or not (□) to 8 nM AMH. Real-time PCR was used to quantify the decrease in *Rgmb* expression. *Rgmb* expression dropped about 75% in GC transfected with the siRNA targeting *Rgmb* when compared to a control siRNA (D, $n=6$). Western blot with a phospho-Smad1/5/8 antibody (E, $n=4$) and real-time PCR on *Id3* gene (G, $n=6$) showed that the knockdown of *Rgmb* does not affect AMH signalling pathway. Western blots were quantified and normalized from 4 experiments (F, $n=4$). Data were analyzed using paired *t*-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, a: $p=0.074$. AMH response was not significantly different between control siRNA and *Rgmb* siRNA transfected GCs. doi:10.1371/journal.pone.0081551.g006

duct retention in males occurs only when the three genes *Smad1/Smad5/Smad8* are conditionally inactivated [16]. Consistently, using siRNA against the different Smads, we were not able to decrease Smad expression more than 50% (data not shown).

We then studied which type I receptor was important in the AMH signalling pathway testing the ability of AMH to phosphorylate R-Smad 1/5/8 and to stimulate *Id3* expression in GCs either transfected with siRNA against *Acrv1*, *Bmpr1a* and *Bmpr1b*, or extracted from conditional KO mice for *Acrv1* or *Bmpr1a*. We did not consider *Acrv1*, another type I receptor involved in R-Smad 1/5/8 pathway whose functional ligands are BMP9 and BMP10 [50]. Indeed, previous studies on AMH signalling in different cell types did not show the involvement of this receptor [13–15,17,51–53]. We showed that transfection of GCs with siRNA against *Bmpr1a*, prevents AMH to induce Smad1/5/8 phosphorylation and to regulate *Id3* expression. The use of corresponding conditional knockout mice, support these results. GCs isolated from *Bmpr1a* cKO mice ovaries do not transduce the AMH signal. These results indicate that BMPR-IA is the main AMH type I receptor in GCs. This is also the case for other AMH target cells. Indeed, BMPR-IA is necessary for AMH to mediate Müllerian duct regression since only *Bmpr1a* disruption induces Müllerian duct retention in mice [15]. Similarly, BMPR-IA is essential for AMH to activate Smad 1 in the Sertoli cell line SMAT-1 [17] and

to induce Leydig cells differentiation in mice [53]. In keeping with a role of BMPR-IA in folliculogenesis, the majority of *Bmpr1a* cKO female mice are infertile due to a decrease of spontaneous ovulations and an inhibition of follicular development [24]. Concomitantly, 9 month-old *Bmpr1a* cKO mutant females exhibited increased follicular atresia [24]. Interestingly, the *Amhr2* KO mice also display a follicular atresia [54].

However, there is a redundancy among the type I receptors to transduce AMH effects. Indeed, Müllerian duct regression is blocked in about 50% of the conditional mutant males for *Bmpr1a* and occurs normally in 100% of the conditional mutant males for *Acrv1a*, but 100% of the males generated completely retained Müllerian duct derivatives only when both *Acrv1a* and *Bmpr1a* are conditionally inactivated, [16]. These findings indicate that BMPR-IA is the primary type I receptor required for Müllerian duct regression but that ActR-IA is capable of transducing the AMH signal in the absence of BMPR-IA [16]. Similarly, ActR-IA can compensate for the lack of BMPR-IA in SMAT-1 Sertoli cells [17]. Here we show that both GCs transfected with siRNA against *Acrv1* or isolated from *Acrv1* cKO mice ovaries are able to respond to AMH. Therefore, in contrast to Müllerian duct, Sertoli and Leydig cells, ActR-IA does not act as a secondary type I receptor for AMH in GCs. In addition, BMPR-IB does not have any compensatory effect in the absence of BMPR-IA. Interestingly, *Bmpr1b* KO mice are viable but females are infertile [55]. These females develop severe defects in cumulus expansion and insufficient uterine endometrial gland development. To complete our siRNA results, it would be interesting to study GCs isolated from *Bmpr1b* KO mice.

We needed some AMH target genes to validate the siRNA knockdown experiments. *Cyp19a1* and *Lhcgr* have been described as AMH target genes in a previous study [22]. However, we were unable to use them in the current study because their expression levels were too low in our GCs culture (data not shown), which is consistent with their stage of differentiation. Because AMH regulates genes encoding steroidogenic enzymes in Leydig and Sertoli cells namely *Hsd3b1* and *Cyp11a1* [20,56], we have assayed the expression level of these genes after AMH exposure and could not detect any changes. Finally, since BMPs share some of their signalling pathway components with AMH, we tested some proven BMPs target genes. *Id* genes are BMP2 target genes in osteoblastic cells [57] and in the breast cancer cell line MCF-7 [58]. These proteins function as dominant negative basic helix loop helix (bHLH) transcription factors. They regulate many genes required for growth and differentiation, through the binding to E-box sequences located in the promoter of target genes [59]. *Id* genes are selectively up or down regulated depending on cell conditions [60–62]. In the ovine and hen GCs, the exposure to respectively BMP6 or BMP2 leads to an increase in all *Id* genes expression [60,61]. Conversely, activin A has an inhibitory effect on *Id* gene expression [61]. Similarly, in porcine GCs expression levels of *Id2* and *Id3* are regulated by FSH and cumulus-oocyte-complex in an

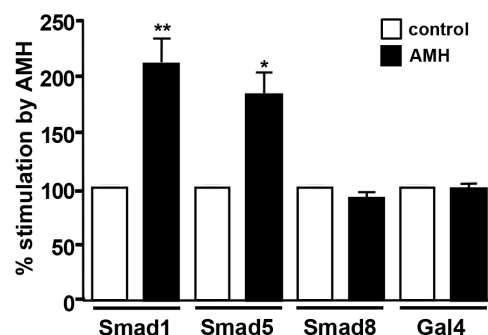


Figure 7. Smad1 and 5 are the main Smads activated by AMH in granulosa cells. GCs were co-transfected with a luciferase reporter construct (UAS-luc) and different expression constructs (Smad-Gal4). Four different expression constructs were transfected in combination with the reporter construct: Smad1-Gal4, Smad5-Gal4, Smad8-Gal4 and Gal4 as a control. Cells were stimulated (■) or not (□) with 8 nM AMH. In the absence of AMH, the fusion protein Smad-Gal4 remained in the cytoplasm which is reflected by a basal expression level of luciferase. After 24h of treatment with AMH, the Smad-Gal4 protein was phosphorylated and could translocate into the nucleus and increase luciferase expression. Firefly luciferase activity measured in control medium was set to 100 arbitrary units. The results are expressed as a percentage of stimulation of Firefly luciferase activity measured in the presence of AMH ($n=3$). Data were analyzed using paired *t*-test. ** $p<0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0081551.g007

opposite way [62]. A recent study has demonstrated a functional relationship between the expression of all *Id* isoforms and the status of GC differentiation [25]. In our study, *Id3* gene expression is upregulated by AMH in immature GCs. Interestingly, *Lhcgr* expression is inversely correlated with *Id3* transcript level in hen undifferentiated GCs [25]. Because knockout studies have led to the conclusion that AMH plays an inhibitory role on follicle maturation [3], *Id3* might be one of the genes involved in this complex process.

In conclusion, using siRNA and transgenic mice for the different components of the AMH signalling pathway, we have shown that, like for the other AMH target cells, the most important type I receptor for AMH in GCs is BMPR-IA. Moreover, the main Smad proteins used by AMH in these cells are Smad 1 and Smad 5. Finally, we have identified a new AMH target gene in these cells, *Id3*, which could be involved in the effects of AMH on the differentiation of GCs and its other target cells.

References

- Josso N, Picard JY, Rey R, di Clemente N (2006) Testicular anti-Mullerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev* 3: 347–358.
- Durlinger AL, Grijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, et al. (2002) Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143: 1076–1084.
- Durlinger AL, Grijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, et al. (2001) Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142: 4891–4899.
- Rey R, Sabourin JC, Venara M, Long WQ, Jaubert F, et al. (2000) Anti-Mullerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. *Hum Pathol* 31: 1202–1208.
- La Marca A, Sighinolfi G, Radi D, Argento C, Baraldi E, et al. (2010) Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Hum Reprod Update* 16: 113–130.
- Massagué J, Gomis RR (2006) The logic of TGFβ signaling. *FEBS Lett* 580: 2811–2820.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* 19: 2783–2810.
- Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, et al. (1994) A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development* 120: 189–197.
- di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, et al. (1994) Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone. *Mol Endocrinol* 8: 1006–1020.
- Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, et al. (1996) Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev* 10: 2577–2587.
- Mishina Y, Whitworth DJ, Racine C, Behringer RR (1999) High specificity of Mullerian-inhibiting substance signaling in vivo. *Endocrinology* 140: 2084–2088.
- Belville C, Josso N, Picard JY (1999) Persistence of Mullerian derivatives in males. *Am J Med Genet* 89: 218–223.
- Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, et al. (2000) Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Mullerian hormone and its type II receptor. *J Biol Chem* 275: 27973–27978.
- Clarke TR, Hoshiya Y, Yi SE, Liu X, Lyons KM, et al. (2001) Mullerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression. *Mol Endocrinol* 15: 946–959.
- Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR (2002) Requirement of Bmpr1a for Mullerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* 32: 408–410.
- Orvis GD, Jamin SP, Kwan KM, Mishina Y, Kaartinen VM, et al. (2008) Functional redundancy of TGF-β family Type I receptors and receptor-Smads in mediating AMH-induced Mullerian duct regression in the mouse. *Biol Reprod* 78: 994–1001.
- Belville C, Jamin SP, Picard JY, Josso N, di Clemente N (2005) Role of type I receptors for anti-Mullerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line. *Oncogene* 24: 4984–4992.
- Halbrooks PJ, Ding R, Wozney JM, Bain G (2007) Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *J Mol Signal* 2: 4.

Supporting Information

Table S1 Primers sequences used for mouse genotyping (Wt:wild-type allele, Mt:mutant allele).
(DOC)

Table S2 Primers sequences used for RT-PCR and real-time PCR.
(DOC)

Acknowledgments

We thank Richard Behringer for mice and helpful comments on the manuscript and Dominique Mahé for helping us with the flow cytometry analysis. We acknowledge Plateforme AnimEx Clamart for taking care of our mouse colony.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SPJ LS. Performed the experiments: LS HM. Analyzed the data: LS SPJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: AL RLC JYP. Wrote the paper: SPJ LS NdC.

- Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, et al. (2002) RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* 419: 392–395.
- Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, et al. (1998) Receptors for anti-Mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 594–599.
- Fynn-Thompson E, Cheng H, Teixeira J (2003) Inhibition of steroidogenesis in Leydig cells by Mullerian-inhibiting substance. *Mol Cell Endocrinol* 211: 99–104.
- di Clemente N, Goxe B, Remy JJ, Cate RL, Josso N, et al. (1994) Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 2: 553–558.
- Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, et al. (2011) Anti-Mullerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril* 96: 1246–1251 e1241.
- Edson MA, Nalam RL, Clementi C, Franco HL, Demayo FJ, et al. (2010) Granulosa cell-expressed BMPR1A and BMPR1B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development. *Mol Endocrinol* 24: 1251–1266.
- Johnson AL, Haugen MJ, Woods DC (2008) Role for inhibitor of differentiation/deoxyribonucleic acid-binding (Id) proteins in granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 149: 3187–3195.
- Ruzinova MB, Benezra R (2003) Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13: 410–418.
- di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, et al. (2010) Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-β. *Mol Endocrinol* 24: 2193–2206.
- Kubler NR, Reuther JF, Faller G, Kirchner T, Ruppert R, et al. (1998) Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27: 305–309.
- Mishina Y, Crombie R, Bradley A, Behringer RR (1999) Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 213: 314–326.
- Mishina Y, Suzuki A, Ueno N, Behringer RR (1995) Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 9: 3027–3037.
- Dudas M, Sridurongrit S, Nagy A, Okazaki K, Kaartinen V (2004) Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells. *Mech Dev* 121: 173–182.
- Mishina Y, Hanks MC, Miura S, Tallquist MD, Behringer RR (2002) Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis* 32: 69–72.
- Campbell KL (1979) Ovarian granulosa cells isolated with EGTA and hypertonic sucrose: cellular integrity and function. *Biol Reprod* 21: 773–786.
- Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, et al. (1996) A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381: 620–623.
- Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N (1984) Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 114: 1315–1320.
- Vashee S, Kodadek T (1995) The activation domain of GAL4 protein mediates cooperative promoter binding with general transcription factors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10683–10687.
- di Clemente N, Josso N, Gouédard L, Belville C (2003) Components of the anti-Mullerian hormone signaling pathway in gonads. *Mol Cell Endocrinol* 211: 9–14.

38. Masiakos PT, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Teixeira J, Fuller AF Jr, et al. (1999) Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. *Clin Cancer Res* 5: 3488–3499.
39. Renaud EJ, MacLaughlin DT, Oliva E, Rueda BR, Donahoe PK (2005) Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 111–116.
40. Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, et al. (2000) Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J Biol Chem* 275: 28371–28379.
41. Matzuk MM, Finegold MJ, Mishina Y, Bradley A, Behringer RR (1995) Synergistic effects of inhibins and Mullerian-inhibiting substance on testicular tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 9: 1337–1345.
42. Li J, Ye L, Sanders AJ, Jiang WG (2012) Repulsive guidance molecule B (RGMB) plays negative roles in breast cancer by coordinating BMP signaling. *J Cell Biochem* 113: 2523–2531.
43. Li J, Ye L, Kynaston HG, Jiang WG (2012) Repulsive guidance molecules, novel bone morphogenetic protein co-receptors, are key regulators of the growth and aggressiveness of prostate cancer cells. *Int J Oncol* 40: 544–550.
44. Xia Y, Cortez-Retamozo V, Niederkofer V, Salie R, Chen S, et al. (2011) Dragon (repulsive guidance molecule b) inhibits IL-6 expression in macrophages. *J Immunol* 186: 1369–1376.
45. Dutertre M, Gouédard L, Xavier F, Long WQ, di Clemente N, et al. (2001) Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Mullerian hormone in transgenic mice. *Endocrinology* 142: 4040–4046.
46. Chang H, Huylebroeck D, Verschuere K, Guo Q, Matzuk MM, et al. (1999) Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development* 126: 1631–1642.
47. Huang Z, Wang D, Ihida-Stansbury K, Jones PL, Martin JF (2009) Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet* 18: 2791–2801.
48. Lechleider RJ, Ryan JL, Garrett L, Eng C, Deng C, et al. (2001) Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Dev Biol* 240: 157–167.
49. Pangas SA, Li X, Umans L, Zwijsen A, Huylebroeck D, et al. (2008) Conditional deletion of Smad1 and Smad5 in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice. *Mol Cell Biol* 28: 248–257.
50. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109: 1953–1961.
51. Lebeurrier N, Launay S, Macrez R, Maubert E, Legros H, et al. (2008) Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin. *J Cell Sci* 121: 3357–3365.
52. Visser JA, Olaso R, Verhoeve-Post M, Kramer P, Themmen AP, et al. (2001) The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling. *Mol Endocrinol* 15: 936–945.
53. Wu X, Zhang N, Lee MM (2012) Mullerian inhibiting substance recruits ALK3 to regulate Leydig cell differentiation. *Endocrinology* 153: 4929–4937.
54. Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, et al. (2007) Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Mullerian hormone null mice. *Endocrinology* 148: 2301–2308.
55. Yi SE, LaPolt PS, Yoon BS, Chen JY, Lu JK, et al. (2001) The type I BMP receptor Bmpr1B is essential for female reproductive function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7994–7999.
56. Messika-Zeitoun L, Gouédard L, Belville C, Dutertre M, Lins L, et al. (2001) Autosomal recessive segregation of a truncating mutation of anti-Mullerian type II receptor in a family affected by the persistent Mullerian duct syndrome contrasts with its dominant negative activity in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4390–4397.
57. Ogata T, Wozney JM, Benezra R, Noda M (1993) Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9219–9222.
58. Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, et al. (2000) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 271–279.
59. Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20: 429–440.
60. Haugen MJ, Johnson AL (2011) Bone morphogenetic protein 2 inhibits FSH responsiveness in hen granulosa cells. *Reproduction* 140: 551–558.
61. Hogg K, Etherington SL, Young JM, McNeilly AS, Duncan WC (2010) Inhibitor of differentiation (Id) genes are expressed in the steroidogenic cells of the ovine ovary and are differentially regulated by members of the transforming growth factor-beta family. *Endocrinology* 151: 1247–1256.
62. Verbraak EJ, van 't Veld EM, Groot Koerkamp M, Roelen BA, van Haefen T, et al. (2011) Identification of genes targeted by FSH and oocytes in porcine granulosa cells. *Theriogenology* 75: 362–376.

3 Résultats supplémentaires : voies alternatives de l'AMH

3.1 Introduction

Plusieurs équipes ont mis en évidence des voies de signalisation alternatives de l'AMH dans différents organes. NF- κ B est une protéine cytoplasmique composée de deux sous-unités : p50 et p65. Elle est maintenue inactive par la liaison à la protéine I κ B. La kinase IKK phosphoryle I κ B en réponse à des signaux extracellulaires ce qui permet la libération de NF- κ B. Une fois libre NF- κ B transloque dans le noyau ce qui permet la régulation de gènes cibles (figure 28 introduction). Des études ont montré que l'AMH pouvait activer la voie de signalisation NF- κ B et l'expression du gène *Iex1*, cible de cette voie, dans la glande mammaire inhibant de ce fait la croissance des cellules cancéreuses (Segev, Ha et al. 2000) (Segev, Hoshiya et al. 2001). Il a également été prouvé que l'AMH pouvait également agir sur la prostate in vivo et in vitro par l'activation de la voie NF- κ B et de son gène cible *Iex1* (Segev, Hoshiya et al. 2002).

La voie des WNTs induit une accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans noyau. En absence de stimulation, la β -caténine est phosphorylée par un complexe de destruction composé de protéines d'ancrage et de kinases. Elle est ensuite liée à des molécules d'ubiquitine et dégradée dans le protéasome. Suite à la liaison des protéines WNTs à leurs récepteurs, le complexe de destruction est inactivé et ne peut plus phosphoryler la β -caténine. La forme non phosphorylée de cette protéine transloque alors dans le noyau (figure 26 introduction). En tant que facteur de transcription, la β -caténine peut réguler les gènes cibles des protéines WNT (Clevers and Nusse 2012). De nombreux rôles sur la fonction reproductrice mâle et femelle ont été décrits pour la voie WNT/ β -caténine. En effet, la β -caténine s'accumule dans le mésenchyme des canaux de Müller et est nécessaire à la régression de ces canaux (Allard, Adin et al. 2000 ; Kobayashi, Stewart et al. 2011). La dérégulation de la voie de la β -caténine est également à l'origine de cancers testiculaires et ovariens (Chang, Guillou et al. 2009 ; Boerboom, Paquet et al. 2005). L'AMH aurait un rôle dans la suppression des tumeurs testiculaires chez des souris surexprimant la β -caténine (Tanwar, Commandeur et al. 2012).

L'AMH ayant la capacité d'induire les voie NF- κ B et β -caténine dans de nombreux types cellulaires ou organes, nous avons cherché à savoir si elle pouvait également transduire

son signal via ces deux voies de signalisation dans les CG.

3.2 Matériels et méthodes

Pour cette partie du projet nous avons utilisé, comme précédemment, la culture primaire de cellules de la granulosa réalisée à partir d'ovaires de souris immatures de 3 semaines. Nous avons en parallèle utilisé la lignée de cellules de la granulosa ATC (Dutertre, Gouédard et al. 2001).

Dans un premier temps, les CG et les cellules de la lignée ATC ont été exposées à de l'AMH et nous avons analysé la phosphorylation des protéines I κ B et β -caténine en western blot. Ensuite, une approche de gènes rapporteurs a été utilisée uniquement dans les CG, les cellules de la lignée ATC n'étant pas transfectables. Le vecteur TOPflash qui comprend un promoteur synthétique contenant des sites de liaison pour les facteurs nucléaires TCF/LEF a été transfecté dans les CG pour étudier l'effet d'une exposition à l'AMH sur la voie β -caténine. La construction pNF- κ B-luc contenant des sites de liaison pour les facteurs nucléaires NF- κ B a été utilisée pour analyser le rôle potentiel de l'AMH sur cette voie. Le protocole détaillé est présenté dans la partie matériels et méthodes de ce manuscrit (page 149). Pour finir, nous avons analysé dans les CG stimulées à l'AMH l'expression du gène cible de la voie NF- κ B, *I κ B α* .

3.3 Résultats

La lignée ATC et les cellules de la granulosa en culture primaire répondent à l'AMH par l'augmentation de la phosphorylation des Smad1/5/8 intracellulaires (figure 38 A et D). Dans la lignée ATC, on observe une diminution du pool de p- β caténine en réponse à l'AMH (figure 38 B). La forme phosphorylée de la β -caténine étant la forme inactive, il semblerait que l'AMH active la voie β -caténine dans cette lignée. En revanche, il n'y a pas de variation du pool de p-I κ B en réponse à l'AMH (figure 38 C). L'AMH ne semble pas avoir d'effet sur la voie NF- κ B.

En revanche, dans les cellules de la granulosa en culture primaire, l'effet de l'AMH sur la voie β -caténine est opposé à celui observé dans la lignée ATC. En effet, on observe une augmentation du pool de p- β caténine en réponse à l'AMH (figure 38 E). Il semble donc que l'AMH inhibe la voie β -caténine dans les CG. Le résultat pour la voie NF- κ B est similaire pour les deux types cellulaires. On ne note aucune variation du pool de p-I κ B en réponse à

l'AMH (figure 38 F).

La lignée ATC n'étant pas transfectable, la technique de gènes rapporteurs a été uniquement réalisée sur les CG. Les gènes rapporteurs TOP flash et pNF-kB-luc ont été transfectés dans les CG qui ont ensuite été mise en présence d'AMH (figure 39 A et B). Suite à la transfection du gène rapporteur TOP flash et à l'exposition à l'AMH on observe une légère diminution (environ 20%) de l'expression de la luciférase (figure 39 A). Ce résultat est en accord avec le western montrant que l'AMH inhibe légèrement la forme active de la β -caténine.

Les résultats pour la voie NF-kB sont variables. On observe une très faible diminution de l'expression de la luciférase dans la première expérience que nous avons réalisé alors que la seconde expérience montre une augmentation de près de 50% (figure 39 B). Le western blot ne montrant aucune variation de la phosphorylation d'IkB en réponse à l'AMH, il semble que l'AMH n'ait pas d'effet sur la voie NF-kB. Pour compléter ce résultat, nous avons analysé l'expression d'un gène cible de la voie NF-kB, *Iex1* (figure 40). Suite à une exposition à l'AMH, l'expression du gène *Iex1* n'est pas modifié ce qui confirme les résultats précédents.

3.4 Discussion

Les résultats présentés montrent que les CG exposées à l'AMH ne semblent pas avoir de modifications de la voie NF-kB. La phosphorylation du facteur IkB reste à l'état basal suite à la stimulation. De plus, les résultats de gènes rapporteurs sont variables et n'apportent pas de réponse. Pour finir, l'AMH n'augmente pas l'expression d'*Iex1*. L'expression de ce gène est régulée par NF-kB dans les cellules de la glande mammaire et prostatiques (Segev, Ha et al. 2000 ; Segev, Hoshiya et al. 2001 ; Segev, Hoshiya et al. 2002). Il semblerait donc que la voie de signalisation NF-kB ne soit pas une voie de signalisation alternative de l'AMH dans les CG.

Concernant la voie de signalisation de la β -caténine, les résultats ne sont pas tranchés mais il semblerait que l'AMH inhibe cette voie. L'exposition des CG à de l'AMH induit une augmentation de la phosphorylation de la β -caténine qui est la forme dégradée par le protéasome. Les expériences utilisant la transfection du gène rapporteur TopFlash montrent une diminution d'environ 20% de l'expression de la luciférase après stimulation des CG avec

de l'AMH. Il a été montré que l'AMH régulait négativement le gène *Cyp19a1* (aromatase) dans les cellules de la granulosa (di Clemente, Goxe et al. 1994). Une étude a également mis en évidence que la β -caténine augmentait l'expression de *Cyp19a1* induite par la FSH dans les cellules de la granulosa (Parakh, Hernandez et al. 2006). On peut supposer que l'inhibition de la voie β -caténine par l'AMH participe à la régulation négative de l'expression de *Cyp19a1*. Un rôle anti-prolifératif de l'AMH sur des cellules de la granulosa cancéreuses a été décrit dans plusieurs études (Masiakos, MacLaughlin et al. 1999 ; Chin, Parry et al. 1991 ; Ha, Segev et al. 2000 ; Stephen, Masiakos et al. 2001). De plus, la surexpression de la β -caténine est la cause de tumeurs dans les cellules de Sertoli et de la granulosa (Chang, Guillou et al. 2009 ; Boerboom, Paquet et al. 2005). Or l'AMH inhibe cette voie ce qui serait en faveur d'un rôle anti-prolifératif et anti-cancéreux de l'AMH dans les CG.

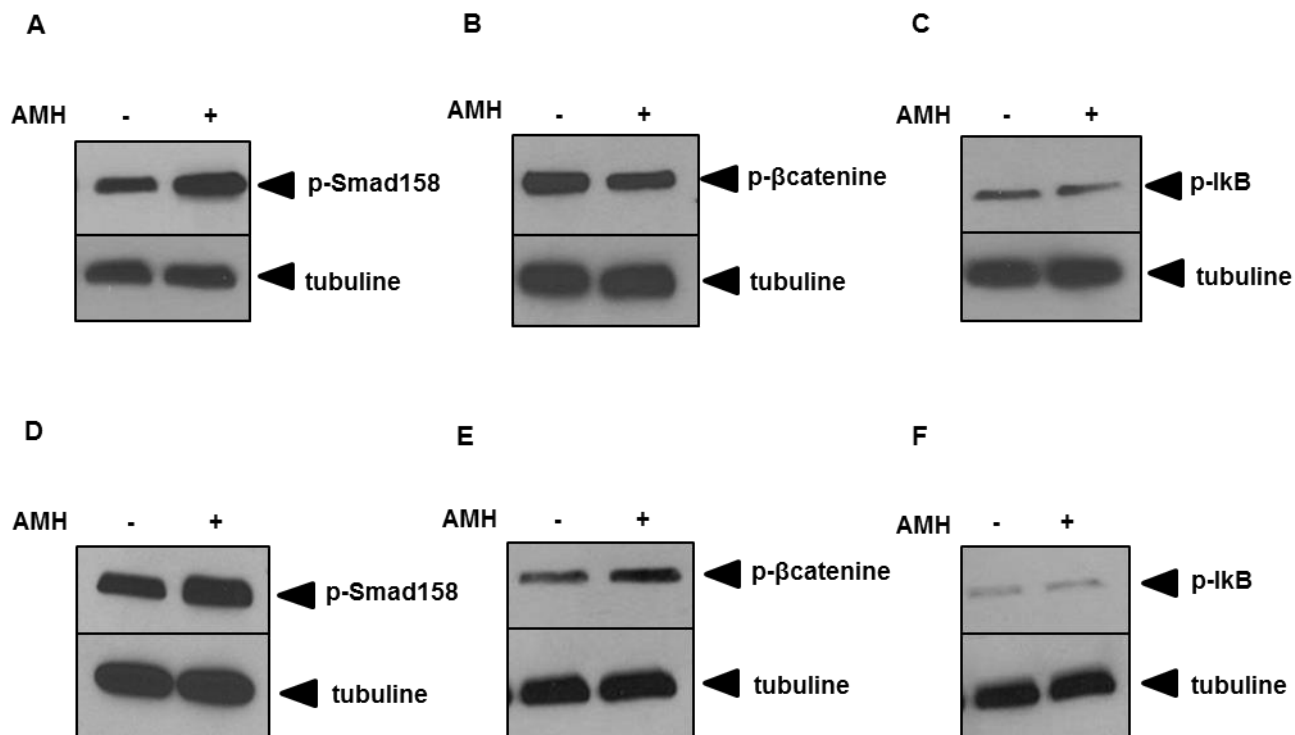


Figure 38 : Voies de signalisation alternatives de l'AMH dans les cellules de la granulosa. La lignée de cellules de la granulosa ATC (panel du haut) et des CG en culture primaires (panel du bas) ont été stimulées à l'AMH (8nM). La phosphorylation des Smad1/5/8 a été vérifiée par western blot pour vérifier la réponse à l'AMH (A et D). La phosphorylation de la β -caténine (B et E) et de la protéine I κ B (C et F) a été analysée par western blot (n=2).

□ - AMH
 ■ + AMH

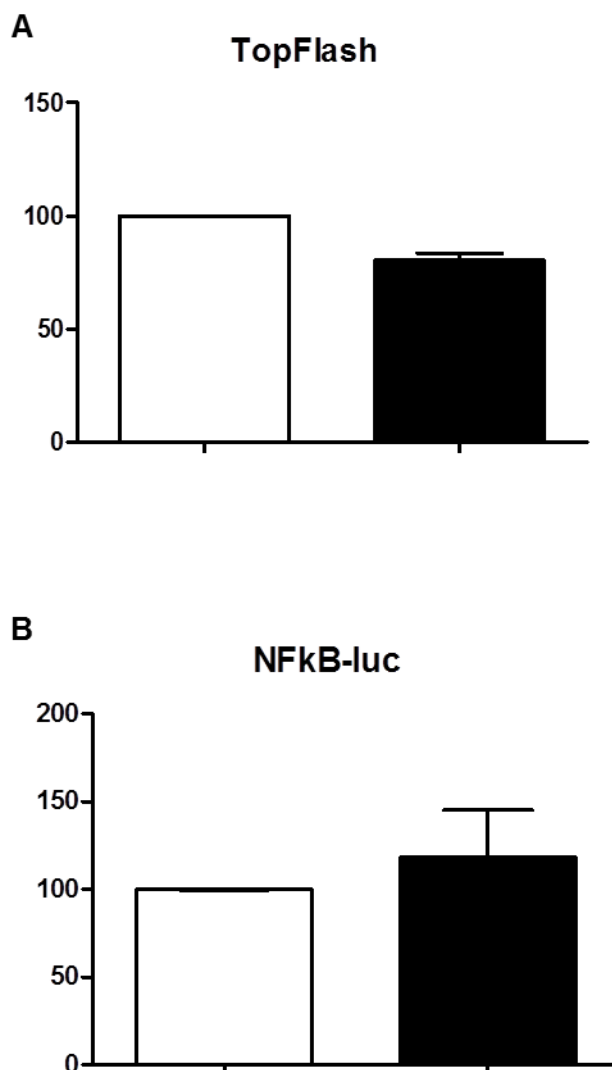


Figure 39: Voies alternatives de l'AMH dans les CG: technique de gènes rapporteurs. Les CG ont été transfectées à l'aide de plasmides codant pour la luciférase placée sous des promoteurs spécifiques de la voie β -caténine ou de la voie NF- κ B. Après transfection du gène rapporteur TOP Flash permettant d'observer l'activation de la voie β -caténine, les CG ont été stimulées à l'AMH (8nM) (A). Après transfection du gène rapporteur p-NF- κ B-luc permettant d'observer l'activation de la voie NF- κ B, les CG ont été stimulées à l'AMH (8nM) comme précédemment (B). Les colonnes roses représentent deux expériences indépendantes et la colonne bleue foncée représente la moyenne des deux expériences (A et B) (n=2).

□ - AMH
■ + AMH

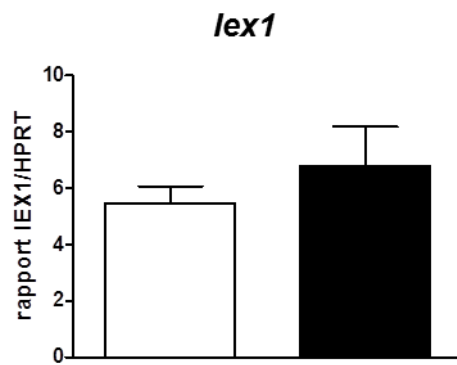


Figure 40 : *lex1* n'est pas régulé par l'AMH.
Les CG ont été mises en culture et stimulées à l'AMH 8nM pendant 3 heures. L'expression du gène *lex1* a été analysé par qPCR (n=6).

II Gènes cibles de l'AMH dans les cellules de la granulosa immatures

1 Introduction

La seconde partie de mon projet de thèse visait à identifier de nouveaux gènes dont l'expression transcriptionnelle était sous influence (directe ou indirecte) de l'AMH dans les cellules de la granulosa murines immatures. En effet, à l'heure actuelle, peu de ces gènes, que nous qualifierons de « gènes cibles de l'AMH » dans la suite de ce manuscrit, sont connus dans l'ovaire, ne permettant qu'une compréhension partielle du rôle de cette hormone dans le contexte ovarien.

Afin de répondre à cette question, j'ai entrepris deux types d'approches. Un premier projet avait pour objectif d'identifier et classer des profils d'expression montrant un différentiel significatif entre des ovaires contrôles (souris sauvages) et des ovaires issus de souris « knock-out » pour l'*Amh* (*Amh*^{-/-}). Le second projet visait à comparer le transcriptome des cellules de la granulosa issues de souris sauvages exposées ou non à de l'AMH recombinante pendant 6h et 24h. L'objectif de ce deuxième projet était de discriminer des gènes différentiellement exprimés suite à une exposition à l'AMH et non pas dans un contexte où l'AMH est absente depuis la naissance de l'animal comme c'est le cas chez les souris KO. Ce second crible transcriptomique s'inscrivait donc dans la continuité du premier projet. Nous avons opté pour une approche globale basée sur les puces MoGene® 2.0 ST (Affymetrix), ces dernières possédant des sondes nucléotidiques (ou « probesets ») spécifiques pour plus de 30.000 gènes parmi lesquels 2.000 non-codants.

2 Matériels et Méthodes

2.1 Puce à ADN (Micro-array) : protocole

Le protocole de l'expérience est détaillé dans le chapitre « matériels et méthodes » de ce manuscrit (page 159).

a Analyse bioinformatique des données

- ***Contrôle qualité et normalisation des données d'expression***

L'ensemble des étapes décrites ci-après ont été réalisées à l'aide du logiciel AMEN

(Annotation, Mapping, Expression and Network suite of tools). Cette plateforme d'analyse a été développée par F. Chalmel (Chargé de Recherche Inserm) pour traiter et analyser des données dites « omiques » (transcriptomique, protéomique), telles que celles obtenues suite à la lecture des puces hybridées dans ces deux projets (Chalmel and Primig 2008).

La qualité individuelle des puces à ADN sur lesquelles ont été hybridés les échantillons d'ARN totaux est inspectée par examen de la distribution de l'intensité sur la surface de la puce et de la dégradation de l'ARN, afin d'écarter celles présentant des anomalies flagrantes. L'ensemble des échantillons vont ensuite être normalisés à l'aide de l'algorithme RMA (Robust Multi-array Average) implémenté dans AMEN, pour éliminer le bruit de fond « intra-puce » et permettre la comparaison « inter-puce » des données (figure 41 A et figure 49 A).

- ***Filtration statistique***

Chacune des étapes de filtration décrite repose sur la définition d'une valeur d'intensité seuil, au-dessous de laquelle nous avons considéré être dans le bruit de fond (« Background Expression Cutoff », ou « BEC »). Dans le cadre de nos analyses, ce seuil correspond à la médiane de l'ensemble des signaux sur les puces. Cette valeur est liée à une observation empirique : environ 50% des gènes du génome s'exprime dans une condition expérimentale donnée. Au-delà de ce seuil de détection, l'intensité mesurée correspond à une activité transcriptionnelle réelle du gène. Parmi les gènes retenus après la normalisation du bruit de fond, seuls les gènes ayant un différentiel (« fold-change ») d'expression d'au moins 1,5 entre les deux conditions testées ont ensuite été conservés.

Enfin, les tests statistiques utilisés sont réalisés à l'aide du « package LIMMA » et correspondent pour chaque comparaison à un test de student. La valeur de p est habituellement de 0.05, c'est-à-dire que les tests statistiques sont réalisés avec une erreur de 5%. L'analyse des données de micro-array nécessite de réaliser simultanément les tests statistiques pour comparer l'expression d'un grand nombre de transcrits (environ 20 000 après élimination du bruit de fond). Lorsqu'un grand nombre de tests est réalisé simultanément il est nécessaire d'ajuster la valeur de p pour réduire le pourcentage d'erreur. Cette valeur est ajustée par la méthode décrite en 1995 par Benjamini et Hochberg. Pour chaque condition à tester, les puces ont été réalisées en triplicat. Pour les groupes de petite taille, le « package LIMMA » utilise la méthode d'analyse empirique de Bayes (Smyth 2004) (figure 41 B et figure 49 B).

b ***Validation des gènes sélectionnés***

- ***Validations expérimentales***

Pour valider les gènes sélectionnés, nous avons dans un premier temps vérifié les variations d'expression des transcrits sur de nouveaux échantillons par q-PCR. Nous avons ensuite, quand c'était possible, localisé la protéine d'intérêt par immunohistochimie. Enfin, nous avons analysé les variations d'expression protéique par immunocytochimie. L'ensemble des protocoles est décrit dans le chapitre matériels et méthodes.

- ***Analyse des régions promotrices***

Nous avons voulu vérifier la présence de sites de liaison des Smad ou Smad binding element (SBE) sur les régions régulatrices des gènes d'intérêts. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Aurélie Lardenois. Les séquences consensus des sites de fixation des Smad binding elements sont issues de la banque Transfac professionnelle (release 2012.4). La recherche de SBE a été effectuée sur une région allant de -10 kb à +10 kb par rapport au site d'initiation de la transcription de chaque gène (figure 48). Sur les images, les courbes en rouge représentent la conservation de la séquence génomique au cours de l'évolution (comparaison des séquences de 30 vertébrés). Les boîtes grises et noires correspondent aux exons des gènes étudiés ou de leurs gènes voisins. La conservation de la séquence génomique est exprimée dans le score phastcons qui va de 0 à 1, le rouge est intense quand le score dépasse 0,8. Ce score correspond au calcul de la conservation au cours de l'évolution de chaque base, chez 30 espèces de vertébrés. Les données obtenues sont ensuite moyennées pour obtenir le score d'une séquence voulue. Les éléments de fixation des Smad sont représentés en couleurs faiblement intenses quand ils sont dans des régions de faibles conservations et ceux qui sont fortement conservés sont représentés en couleurs plus intenses.

3 **Résultats**

3.1 **Ovaires contrôles (WT) versus ovaires déficients en AMH (KO *Amh*)**

a ***Analyses des données brutes***

Les puces à ADN permettent d'analyser les modifications transcriptionnelles globales d'un échantillon placé dans des conditions différentes. Ici, nous avons comparé les

transcriptomes d'ovaires entiers et d'ovaires invalidés pour le gène de l'*Amh*. Les ARNs de chaque échantillon ont été extraits à partir d'ovaires de 3 souris WT ou KO pour l'*Amh*. Les puces ont ensuite été réalisées en triplicats. L'analyse se fait sur la moyenne des signaux obtenus pour chaque transcrit. Elle débute par la normalisation des données inter-puces pour permettre leur comparaison (figure 41 A). Ensuite, les filtrations précédemment décrites sont réalisées pour déterminer les transcrits significativement dérégulés entre les ovaires WT et KO pour l'*Amh*.

Après normalisation, 16027 transcrits montraient une expression supérieure au seuil de détection (\geq B.E.C, 6,05) dans au moins une des deux conditions. Parmi ceux-ci, seulement 140 possédaient un différentiel (« fold-change ») d'expression d'au moins 1,5 entre les deux conditions (figure 41 B). Enfin, un test statistique (LIMMA) a permis d'identifier 115 transcrits dont l'expression était significativement altérée de manière positive (102 transcrits) ou négative (13 transcrits) dans les ovaires mutants (KO *Amh*) (figure 41 B). L'intensité d'expression des transcrits différentiellement régulés dans les différents échantillons est représenté sur une carte colorimétrique ou « heatmap » (figure 42 A). De nombreuses sondes nucléotiques avec un profil différentiel significatif ne s'apparentaient à aucun transcrit/gène connu. Les deux groupes de gènes dérégulés, positivement et négativement, ont fait l'objet d'investigations fonctionnelles par le biais notamment de calculs d'enrichissements significatifs (figure 42 B). On parle d'enrichissement lorsque, pour une fonction donnée, le nombre de transcrits dont l'expression est modifiée est plus importante que si ils avaient été choisis au hasard. Parmi les transcrits régulés positivement dans l'ovaire KO *Amh*, on ne note aucun enrichissement fonctionnel. En revanche, en ce qui concerne les transcrits régulés négativement, on observe un enrichissement des transcrits codant pour des composants extracellulaires. La figure 42 C représente le réseau des interactions protéiques connu pour les transcrits dérégulés dans l'ovaire KO *Amh*. Les ronds bleus représentent les protéines codées par les transcrits régulés négativement dans l'ovaire KO *Amh* et les rouges les protéines codées par les transcrits régulés positivement (figure 42 C). Les ronds gris représentent leurs partenaires protéiques connus.

Pour une meilleure visibilité, les résultats obtenus pour les gènes connus différentiellement régulés dans l'ovaire KO *Amh* ont été synthétisés sous forme de tableau (figure 43).

b **Gènes sélectionnés et validation**

• Validation par q-PCR

La régulation négative la plus importante est observée pour le transcrit correspondant à l'*Amh*. L'*Amh* est 24 fois moins exprimée dans l'ovaire KO. Ceci représente un bon contrôle interne d'expérience validant ainsi le modèle utilisé (figure 43).

Parmi les gènes sélectionnés, nous avons choisi, dans un premier temps de valider certain d'entre eux par q-PCR sur 8 nouveaux échantillons d'ovaires WT et KO *Amh*. Nous nous sommes intéressés à ceux dont la variation d'expression était la plus importante, à savoir *Ovgp1* (Oviductal glycoprotein1), *Kcnj2* (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2), et *Tdg* (Thymine DNA glycosylase). Nous avons pu confirmer les résultats des puces pour le gène *Kcnj2* dont l'expression est significativement diminuée dans l'ovaire KO *Amh* (figure 44). Bien que le résultat ne soit pas significatif, on observe également une diminution de l'expression transcriptionnelle d'*Ovgp1* dans l'ovaire KO. L'augmentation du nombre d'échantillons devrait permettre d'obtenir un résultat significatif. En revanche, le résultat est surprenant en ce qui concerne l'expression du gène *Tdg*. En effet, sur les nouveaux échantillons, aucune différence transcriptionnelle n'est observable entre les ovaires WT et KO *Amh*. Ce résultat peut être expliqué par l'expression d'un pseudo-gène, gm9855, également détectée par les mêmes sondes. En effet, la séquence de ce pseudo-gène est extrêmement proche de la séquence du transcrit *Tdg*. La variation d'expression observée entre l'ovaire WT et KO *Amh* pourrait être due à une expression différentielle de ce pseudo-gène et non du gène en lui-même.

• Validation protéique

Nous avons choisi d'étudier le gène *Ovgp1* qui est ~4 fois moins exprimé dans l'ovaire KO *Amh* (figure 43). Ce gène dont l'expression a été initialement décrite dans l'oviducte est le seul pour lequel des rôles sur la fonction reproductrice ont été décrits. Il semblait donc intéressant de poursuivre sa caractérisation.

J'ai étudié la localisation de la protéine OVGP1 dans l'ovaire WT et KO *Amh* de 3 et 8 semaines par immunohistochimie (figure 45 et 46). A 3 semaines, l'expression d'OVGP1 est observable dans les cellules de la granulosa. Il est intéressant de noter que dans l'ovaire KO *Amh*, son expression diminue dans ces mêmes cellules mais semble augmenter dans celles de

la thèque. A 8 semaines, l'expression d'OVGP1 est toujours marquée dans les cellules de la granulosa mais apparaît également dans les cellules de la thèque. Tout comme dans l'ovaire à 3 semaines, l'expression d'OVGP1 diminue dans les ovaires KO *Amh*. Il est à noter qu'une expression de cette protéine est également observable dans les cellules lutéales mais de manière plus atténuée que dans les CG des grands follicules antraux. J'ai réalisé cette expérience sur 3 ovaires de chaque condition. L'ensemble des résultats est synthétisé sous forme de tableau (tableau 11). Pour réaliser ce tableau, j'ai utilisé une échelle colorimétrique. Pour chaque teinte de marron, j'ai associé arbitrairement un nombre de croix. J'ai ensuite évalué le marquage pour chaque type folliculaire sur chacune de mes lames. Les résultats présentés dans le tableau représentent la moyenne des trois lames pour chacune des conditions testées.

J'ai ensuite utilisé une technique d'immunofluorescence dans le but de détecter l'expression de la protéine OVGP1 dans des cellules de la granulosa (CG) isolées à partir d'ovaire WT et d'ovaires KO pour l'*Amh*. L'observation d'une expression plus faible dans les cellules de la granulosa KO a confirmé les résultats obtenus précédemment (figure 47). Néanmoins ce résultat préliminaire reste à confirmer. En effet, l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et il est primordial de vérifier l'expression d'OVGP1 sur des CG isolées à partir de plusieurs souris WT et KO pour l'*Amh*.

- **Recherche de Smad binding element (SBE)**

L'ensemble des résultats montrent que le gène *Ovgp1* est dérégulé dans l'ovaire KO *Amh*. L'AMH transduit son signal via les protéines Smad qui se lient, en association avec d'autres facteurs de transcription, aux séquences régulatrices de gènes cibles. Nous avons donc vérifié la présence de Smad binding element (SBE) sur les régions régulatrices d'*Ovgp1*. Les SBE sont des séquences courtes et de ce fait, on en trouve un grand nombre dans le génome. Ces séquences sont représentées par des traits de couleurs pâles (figure 48 A). Pour discriminer les SBE susceptibles d'être des éléments régulateurs, seuls ont été retenus ceux conservés au cours de l'évolution chez une trentaine de vertébrés. Les SBE conservés au cours de l'évolution sont représentés par des traits de couleurs foncées (figure 48 A). En ce qui concerne le gène *Ovgp1*, aucun SBE conservé n'est présent sur la séquence de 1kb précédent le site d'initiation de la transcription ni dans le premier intron. Les SBE pour les Smad1 et 5 les plus proches sont situés entre -5 kb et -10 kb. Bien que ces séquences puissent

jouer un rôle dans la régulation d'*Ovgp1*, il est plus raisonnable d'émettre une hypothèse de régulation indirecte des protéines Smad1 et 5.

En revanche, en ce qui concerne le gène *Kcnj2*, on trouve des SBE conservés à moins de 1kb du site d'initiation de la transcription ainsi que dans le premier intron. Il semblerait donc que le gène *Kcnj2* soit une cible directe potentielle des Smad1 et 5. L'AMH en induisant la phosphorylation des protéines Smad1 et 5 pourrait réguler l'expression de *Kcnj2* de façon directe (figure 48 B). Cependant, cette hypothèse devra être confirmée par des techniques complémentaires.

3.2 Cellules de la granulosa exposées à l'AMH : Analyse des données brutes

Nous avons ensuite voulu comparer les transcriptomes de CG exposées ou non pendant 6 h ou 24 h à de l'AMH recombinante. Nous voulions, par cette approche, différencier les gènes dont l'expression était modifiée par l'AMH de façon précoce (après seulement 6 h d'exposition) ou tardive (après 24 h d'exposition). Les ARNs de chaque échantillon ont été extraits à partir de CG isolées d'un pool d'ovaires de 3 souris. Les puces ont ensuite été réalisées en triplicats. L'analyse se fait, comme précédemment, sur la moyenne des signaux obtenus pour chaque transcrit. La première étape consiste à normaliser les données inter-puces pour permettre leur comparaison (figure 49 A). Nous avons comparé séparément les transcriptomes des CG contrôles/CG exposées 6h et des CG contrôles/CG exposées 24h. Une série de filtration est réalisée pour déterminer les transcrits significativement dérégulés entre les différentes conditions (figure 49 B).

Après une première étape de normalisation, 15,642 gènes montraient une expression supérieure au seuil de détection (\geq B.E.C, 5,62) dans la comparaison cellules de la granulosa contrôles vs cellules de la granulosa traitées à l'AMH pendant 6 h (figure 49 B). Parmi ceux-ci, seulement 127 possédaient un différentiel (« fold-change ») d'expression d'au moins 1,5 entre les deux conditions. Enfin, un test statistique (LIMMA) m'a permis d'identifier 43 loci dont l'expression était significativement altérée de manière positive (15 gènes) ou négative (28) dans les cellules de la granulosa traitées à l'AMH pendant 6 h (figure 49 B).

De manière analogue, 15,740 gènes montraient une expression supérieure au seuil de détection (\geq B.E.C) dans la comparaison cellules de la granulosa contrôles vs cellules de la granulosa traitées à l'AMH pendant 24 h. Parmi ceux-ci, seulement 129 possédaient un

différentiel (« fold-change ») d'expression d'au moins 1,5 entre les deux conditions. Enfin, un test statistique (LIMMA) m'a permis d'identifier 27 loci dont l'expression était significativement altérée de manière positive (1 gène) ou négative (26) dans les cellules de la granulosa traitées à l'AMH pendant 24 h (figure 49 B).

J'ai ensuite souhaité comparer ces deux analyses afin d'identifier les gènes sélectionnés dont l'expression était significativement modifiée à 6 h et à 24 h (figure 49 C). Si aucun gène n'a montré un différentiel positif aussi bien à 6 h qu'à 24 h, 14 loci ont montré une régulation négative similaire entre les deux conditions de traitement par rapport aux contrôles. Cette représentation a permis de former 6 groupes de transcrits. Le groupe 1 représente les transcrits régulés négativement uniquement après 6 h d'exposition à l'AMH. Le groupe 2 rassemble les transcrits régulés négativement après 6 h et après 24 h d'exposition. Le groupe 3 correspond aux transcrits régulés négativement uniquement après 24 h d'exposition. Les groupes 4, 5 et 6 suivent le même schéma que les groupes 1, 2 et 3 mais pour les gènes régulés positivement après une exposition à l'AMH.

La cartographie colorimétrique (heatmap) offre une représentation visuelle de l'intensité d'expression des transcrits différentiellement régulés dans les différents échantillons (figure 50 A). Dans cette étude comme dans la précédente, de nombreuses sondes nucléotiques avec un profil différentiel significatif ne s'apparentaient à aucun transcrit/gène connu. La figure 50 B représente le réseau d'interactions protéiques connu des transcrits dérégulés dans les CG exposées à de l'AMH. Des couleurs ont été attribuées aux transcrits des groupes 1 à 6 (figure 50 B). Comme dans l'étude précédente, les ronds gris représentent les protéines interagissant avec celles codées par les transcrits d'intérêts. Pour une meilleure visibilité, les résultats obtenus pour les gènes connus ont été synthétisés sous forme de tableau (figure 51).

Parmi ces gènes, on observe une régulation négative de *Cyp17a1* à 6 h et à 24 h. L'AMH régule l'expression de certains gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse, dont fait partie *Cyp17a1*, dans le testicule. L'étude de ce gène semble donc intéressante pour étudier le rôle de l'AMH sur la stéroïdogénèse ovarienne. Le gène *Cyp11a1* présente également un profil intéressant. Il est régulé positivement par l'AMH après 6 h d'exposition. Ce gène code pour une enzyme impliquée dans la métabolisation des oestrogènes et de nombreux xénobiotiques pénétrant dans l'organisme. L'étude de ce gène semble être une bonne piste à suivre pour définir un rôle potentiel de l'AMH dans cette fonction. Il est également intéressant

de noter que plusieurs microRNA sont régulés négativement par l'AMH. Aucune fonction n'a été décrite pour ces microRNA rendant les analyses complémentaires difficiles. Tout comme pour le premier projet, de nombreuses sondes nucléotidiques ne présentaient aucune annotation.

4 Discussion

Nous avons choisi de comparer les transcriptomes d'ovaires WT et KO pour l'*Amh* d'une part et ceux de GC exposées ou non pendant 6 h ou 24 h à de l'AMH d'autre part. Nous avons obtenu de nombreux transcrits différentiellement régulés entre nos différentes conditions. Seuls peu d'entre eux présentaient des annotations connues nous permettant d'identifier le gène d'intérêt correspondant.

La comparaison des transcriptomes d'ovaires WT et KO *Amh* semblait être la meilleure approche pour définir les gènes dérégulés en l'absence d'AMH. Bien que le but de notre étude soit la découverte de gènes régulés par l'AMH dans les cellules de la granulosa, l'utilisation d'ovaires entiers permettait d'éviter le biais de la mise en culture. Une fois les gènes d'intérêts sélectionnés, l'objectif était de les valider par différentes approches et de déterminer ceux dérégulés dans les CG. L'âge des souris utilisées pour cette première étude a été choisi pour permettre la comparaison avec les CG isolées. En effet, la préparation des CG que nous avons utilisée, est réalisée sur des ovaires de 3 semaines.

4.1 Ovaire WT vs ovaire KO AMH

La comparaison d'ovaires WT et KO pour l'*Amh* à 3 semaines a permis de détecter des gènes différentiellement exprimés. Les résultats obtenus pour les gènes *Kcnj2*, *Tdg* et *Ovgp1* seront discutés dans les paragraphes de ce chapitre. Ces gènes ont été retenus comme étant des cibles intéressantes de l'AMH et validés par différentes approches dans la mesure du possible. J'ai également choisi de discuter les résultats obtenus pour une famille de récepteurs particuliers, les récepteurs voméronasaux.

a La famille VmnXrX

Parmi les transcrits sélectionnés, il est intéressant de noter la présence de nombreux gènes de la famille des récepteurs voméronasaux couplés aux protéines G (heatmap figure 42 A). L'expression de tous les gènes *Vmn* est augmentée dans l'ovaire KO. Le nombre

important de ces gènes dérégulés rendait la validation difficile. Ces récepteurs ont été décrits dans un organe bien particulier appelé organe vomeronasal et sont spécialisés dans la liaison et l'intégration du signal des phéromones (Chamero, Leinders-Zufall et al. 2012). Ils participent à la vie reproductive de l'animal en permettant la sensibilité à ces molécules. Cependant, il n'existe aucune étude démontrant l'expression ou le rôle de ces récepteurs au sein de l'ovaire. L'absence d'AMH semble perturber l'expression de ces récepteurs dans l'ovaire. On peut également imaginer un rôle de l'AMH sur l'expression des récepteurs aux phéromones dans l'organe voméronasal régulant ainsi la maturation de cet organe et la sensibilité à ces molécules.

b ***Le gène Kcnj2***

Le gène *Kcnj2* code pour une protéine formant le canal potassique KIR2.1. Ce gène a essentiellement été étudié dans le cas du syndrome d'Andersen-Tawil (Rajakulendran, Tan et al. 2010). Chez les patients présentant une mutation de ce gène, des arythmies cardiaques sont observées ainsi que des anomalies squelettiques. Les résultats de micro-array complétés par des validations en q-PCR ont montré que l'expression du gène *Kcnj2* est significativement diminuée dans l'ovaire KO *Amh*. De plus, l'analyse des régions régulatrices a révélé la présence de SBE pour les Smad1 et 5. Il semblerait donc que l'AMH puisse réguler directement l'expression de ce gène. A l'heure actuelle, aucune étude ne relate l'expression ni le rôle de ce gène dans l'ovaire. Par sa régulation, l'AMH pourrait agir sur le transport potassique au sein de l'ovaire. Pour pouvoir déterminer avec certitude l'action de l'AMH sur la régulation de ce gène, il faudrait mettre au point une expérience d'immunoprécipitation de chromatine suivie d'une PCR (ou d'un séquençage). Cette expérience permettrait de déterminer si, suite à une exposition à de l'AMH, les Smad1 et 5 phosphorylées se fixent aux SBE potentiels présents sur les séquences régulatrices de *Kcnj2*. L'expérience de ChIP-PCR peut être réalisée sur des CG isolées et transfectées avec un plasmide contenant la séquence promotrice de *Kcnj2*. Suite à une exposition à de l'AMH, les phospho-Smad1/5 peuvent être immunoprécipitées. En choisissant des amorces encadrant le SBE, il sera possible de vérifier si les Smads immunoprécipitées étaient liées ou non au SBE. Une approche de gènes rapporteurs peut également permettre de voir si l'AMH régule ou non le gène *Kcnj2*. Cette technique est basée sur la construction d'un vecteur plasmidique contenant le gène de la luciférase placé sous contrôle du promoteur de *Kcnj2*. Après transfection de ce vecteur dans

les CG (ou dans une lignée cellulaire appropriée) et exposition à de l'AMH, on pourra observer et analyser les variations d'expression de la luciférase.

c Le gène Tdg

La protéine TDG est impliquée dans la réparation des mésappariements de bases, plus particulièrement les mésappariements G/T (Neddermann and Jiricny 1993 ; Neddermann, Gallinari et al. 1996). Plus récemment, des rôles de TDG ont été décrits sur la déméthylation de certaines régions promotrices. Il a été montré que la protéine TDG interagit avec les DNA méthyltransférases DNMT3a et DNMT3b et contrôle leur activité (Li, Zhou et al. 2007). De nombreuses études ont décrit TDG comme un co-activateur transcriptionnel du fait de son action sur le maintien de la déméthylation de la chromatine (Dalton and Bellacosa 2012). Les résultats des puces Affymétrie montrent que le gène codant pour la protéine TDG (Thymine DNA glycosylase) est 4,5 fois plus exprimé dans l'ovaire KO *Amh*. On peut supposer que dans un contexte physiologique normal, l'AMH inhiberait l'expression du gène *Tdg*. L'inhibition de l'expression de *Tdg* pourrait participer à augmenter la méthylation des régions promotrices de certains gènes régulés négativement par l'AMH. Cependant, comme expliqué précédemment, nous n'avons pas réussi à confirmer les résultats des puces sur de nouveaux échantillons par q-PCR. On peut noter que le même groupe de sonde (probeset) détecte le transcrit codant pour TDG mais également un transcrit correspondant au pseudo-gène *Gm9855*. Un pseudogène désigne, dans la plupart des cas, un gène inactif au sein d'un génome, du fait d'altérations génétiques le rendant non-fonctionnel et donc incapable de conduire à l'expression d'une protéine. En effet, les pseudogènes ont souvent perdu leur capacité à être transcrit du fait de mutations de leur région promotrice ou de leur intégration à des régions du génome dites « silencieuse » (Pink, Wicks et al. 2011). La similarité de séquence avec le gène parent rend souvent difficile la mesure de la transcription du pseudogène. Cependant, il existe de nombreux exemples de pseudogènes transcrits, comme le pseudogène *Pten*, dont les transcrits sont d'ailleurs beaucoup plus nombreux que ceux du gène parent (Fujii, Morimoto et al. 1999). Des études montrent également que l'expression des pseudogènes peut varier en fonction des conditions physiologiques. Le gène *Oct4* qui joue un rôle dans le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches présente 6 pseudogènes. Il a été montré que deux d'entre eux sont exprimés dans des lignées ou des tissus cancéreux humains mais pas dans les tissus sains (Suo, Han et al. 2005).

L'expression de ces pseudogènes pourrait, par exemple, avoir un rôle sur la régulation du gène parent dans les tissus cancéreux. Le pseudogène *Gm9855* de *Tdg* se trouve sur le chromosome 10 dans une région du génome où de nombreux gènes s'expriment. Il ne se situe pas dans une région silencieuse et peut donc potentiellement s'exprimer. Pour vérifier l'hypothèse de la surexpression de ce pseudogène dans l'ovaire KO *Amh*, il faudrait utiliser des oligonucléotides spécifiques de la séquence du pseudo-gène et non du gène comme ceux que nous avons utilisé. De plus, on peut supposer que si *Gm9855* s'exprime, son expression est beaucoup plus forte que le gène *Tdg* lui-même. En effet, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de *Tdg* en q-PCR sur de nouveaux échantillons et pourtant on note une augmentation de plus de 4 fois de la transcription dans l'ovaire KO *Amh*. L'hypothèse la plus probable est une expression forte de *Gm9855* par rapport à *Tdg* dans l'ovaire KO *Amh*.

d *Le gène Ovgp1*

Chez de nombreux mammifères dont la souris, les cellules épithéliales de l'oviducte produisent une glycoprotéine spécifique, OVGP1 aussi appelée OGP (oviductal glycoprotein) (Sendai, Komiya et al. 1995). Elle est exprimée pendant la phase lutéale qui suit l'ovulation et de nombreuses études ont montré que son expression serait régulée par les stéroïdes ovariens (Donnelly, Fazleabas et al. 1991 ; Komiya, Onuma et al. 1996 ; Buhi 2002). OGP s'associe avec la membrane des gamètes mâles et femelles avant la fécondation. De nombreuses études montrent des rôles de cette glycoprotéine dans le processus de fertilisation et des premières étapes de clivage embryonnaire. Chez le porc, l'incubation d'ovocytes avec des glycoprotéines spécifiques de l'oviducte diminue la capacité de liaison des spermatozoïdes et de ce fait diminue le taux de polyspermie (Kouba, Abeydeera et al. 2000). Une augmentation du nombre de blastocystes est observée quand le milieu d'incubation utilisé pour la fécondation in vitro est supplémenté en OGP. Chez le bovin, il a été montré que la pré-incubation des ovocytes avec de l'OGP purifiée permet d'augmenter la fertilisation (Martus, Verhage et al. 1998). Chez l'homme et le babouin, il a également été montré que les glycoprotéines spécifiques de l'oviducte purifiées s'associent à la membrane ovocytaire (O'Day-Bowman, Mavrogianis et al. 1996). Cette association permet l'augmentation de la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide. Une étude a également déterminé l'importance de cette glycoprotéine chez le hamster doré. En effet, il semblerait qu'OGP se lie à la fois à la

zone pellucide ovocytaire mais également à la membrane de la tête du spermatozoïde facilitant sa pénétration (Boatman and Magnoni 1995). L'ensemble de ces résultats restent controversés. En effet, toutes ces études utilisent des méthodes de fécondation in vitro ne permettant pas d'appréhender le rôle physiologique de ces glycoprotéines. La souris KO *Ovgp1* a été générée (Araki, Nohara et al. 2003) pour chercher le rôle de ce gène in vivo. Ces souris ne présentent pas de défaut de fécondation. Bien que le nombre de petits par portée semble légèrement diminué par rapport aux souris contrôles, les souris *Ovgp1* KO ne semblent pas présenter de défaut majeur de reproduction.

Dans notre étude, nous avons montré que le gène *Ovgp1* s'exprime dans l'ovaire de souris immatures de 3 semaines et nous avons pu observer une diminution de l'expression de ce gène dans l'ovaire KO pour l'*Amh*. Nous avons également montré pour la première fois la présence de la protéine dans des ovaires de 3 et 8 semaines par immunohistochimie. Un western blot serait intéressant pour compléter cette analyse. Il nous permettrait également de voir si OVGP1 augmente après une exposition à l'AMH de GC isolées. On peut émettre l'hypothèse d'une régulation positive de l'AMH sur ce gène dans des conditions physiologiques normales aux vues de la baisse d'expression d'*Ovgp1* dans l'ovaire KO. OVGP1 pourrait jouer un rôle dans la préparation de l'ovocyte à la fécondation. Il serait intéressant de voir si cette glycoprotéine entoure déjà l'ovocyte quand celui-ci est expulsé de l'ovaire. Des expériences complémentaires permettront de répondre à ces questions.

4.2 CG exposées à l'AMH

Nous avons comparé les transcriptomes de CG isolées à partir d'ovaire WT et exposées pendant 6 h ou 24 h à de l'AMH recombinante. Nous voulions différencier les gènes dont l'expression était modifiée par l'AMH de façon précoce ou tardive. L'ensemble des transcrits dérégulés suite à une exposition à l'AMH est répertorié figure 51. Parmi ces transcrits, on peut noter que l'expression de *Cyp17a1* est significativement diminuée dans les échantillons de cellules de la granulosa exposée à de l'AMH pendant 6 h et 24 h. CYP17A1 est une enzyme responsable de la synthèse de DHEA à partir de la prégnénolone. Cette enzyme n'est pas connue pour être exprimée dans les cellules de la granulosa. De plus, la comparaison du micro-array des CG exposées à l'AMH avec le micro-array de l'ovaire entier montre que l'expression de cette enzyme est 25 fois moins importante dans les CG isolées que dans l'ovaire entier (données non montrées). Ce résultat confirme que l'expression de cette enzyme

est majoritaire dans un type cellulaire de l'ovaire autre que les cellules de la granulosa, à savoir la cellule de la thèque. On peut expliquer cette légère expression dans les CG de différentes façons. Les sondes présentes sur la puce ne possèdent pas toutes la même sensibilité. Or, il est possible que celles qui détectent *Cyp17a1* soient fortes et que le signal passe la première filtration du seuil de détection (Background expression cutoff). Cette hypothèse correspond aux faux positifs de l'expérience. La situation inverse est d'ailleurs possible avec l'élimination de gènes dont les transcrits sont détectés par des sondes de faibles affinités ou sensibilités. Il est également possible qu'une faible contamination de la culture de CG par des cellules de la thèque induise la détection de l'expression de cette enzyme. Une autre hypothèse serait qu'en culture, les CG expriment faiblement *Cyp17a1*. Quelle que soit la raison de cette expression, ce résultat est intéressant car il a déjà été montré que ce gène était une cible de l'AMH dans le testicule. Il est moins exprimé dans le testicule de souris surexprimant l'AMH (Racine, Rey et al. 1998). Par ces résultats, on pourrait confirmer ceux obtenus chez le mâle puisque l'AMH inhibe l'expression de *Cyp17a1* chez la souris femelle immature.

Un autre gène a également attiré notre attention, il s'agit du gène *Cyp11a1*. Il est régulé positivement après une exposition de 6 h à l'AMH. Ce gène code pour une enzyme impliquée dans la métabolisation des xénobiotiques et des oestrogènes (Nebert and Dalton 2006 ; Leighton, Canning et al. 1995 ; Shi, Dragin et al. 2010 ; Masood, Roach et al. 2010). Pour être évacués de l'organisme, ces molécules doivent subir des transformations et les enzymes de la famille des Cytochromes P450, dont CYP11A1, sont les principales enzymes intervenant dans la première phase de leur métabolisation. En ce qui concerne les oestrogènes, CYP11A1 permet la transformation de l'oestradiol et de l'oestrone en hydroxy-oestradiol et hydroxy-oestrone (Masood, Roach et al. 2010). D'autres modifications vont alors survenir pour permettre leur excrétion. L'AMH en augmentant rapidement l'expression de cette enzyme, pourrait permettre d'activer la métabolisation et l'excrétion des oestrogènes pour diminuer leur activité. Il a été montré que les oestrogènes activent la prolifération et la survie des cellules de la granulosa (Dupont, Krust et al. 2000 ; Quirk, Cowan et al. 2004). L'AMH via l'augmentation de l'expression de *Cyp11a1* pourrait diminuer l'effet des oestrogènes sur les cellules de la granulosa. Cette hypothèse est en accord avec le rôle de l'AMH sur la régulation négative de la folliculogenèse. L'AMH pourrait par cette voie inhiber la croissance des

cellules de la granulosa.

La recherche de gènes cibles de l'AMH par une approche de puces à ADN m'a permis de participer activement à des études d'analyse génomique à haut-débit. J'ai acquis les compétences techniques nécessaires à la préparation des échantillons et à l'hybridation sur les puces Affymetrix. J'ai également appris les bases essentielles à l'analyse bioinformatique des données brutes. J'ai pu appréhender les différentes étapes de filtrations des transcrits pour ne sélectionner que ceux dérégulés significativement entre différentes conditions. L'ensemble des expériences de puces réalisé avait pour but de déterminer de nouveaux gènes régulés par l'AMH, directement ou indirectement, dans les cellules de la granulosa murine.

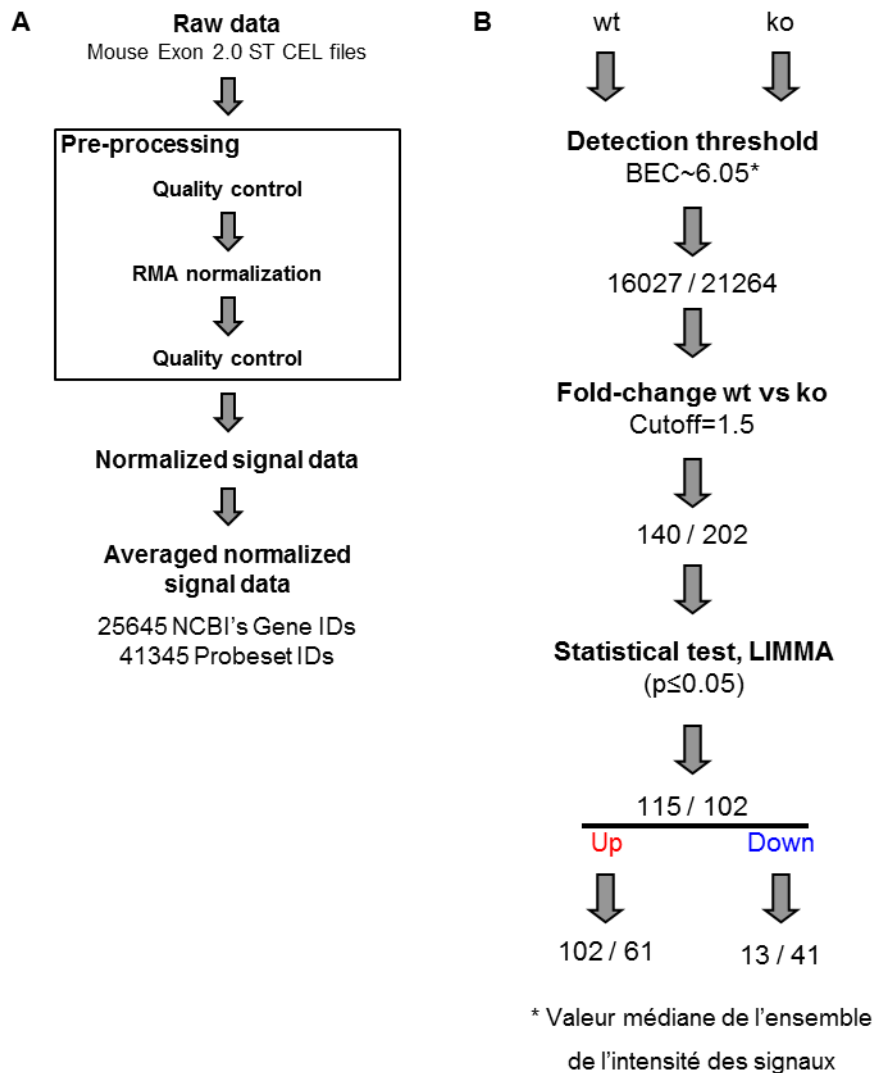


Figure 41: Stratégie de filtration des données. A : Normalisation des données brutes B : Sélection des transcrits par comparaison des données de l'ovaire WT et de l'ovaire KO *Amh*. Le nombre de transcrits et de probeset est donné à chaque étape de filtration. Les 115 transcrits (correspondant à 102 probeset) sont classés en deux groupes. Les transcrits régulés positivement (up) et les transcrits régulés négativement (down) dans l'ovaire KO *Amh*.

		fold	WT	KO	WT1	WT2	WT3	KO1	KO2	KO3
Amh	anti-Mullerian hormone;Mullerian inhibiting substance	-23,59	11,53	6,97	11,5	11,6	11,5	6,77	7,1	7,03
Ovgp1	oviductal glycoprotein 1	-3,61	6,55	4,70	5,5	7,03	7,11	4,92	4,52	4,66
Kcnj2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	-2,06	6,72	5,69	6,78	6,49	6,9	6,08	5,33	5,65
Angptl7	angiopoietin-like 7	-1,96	7,57	6,59	7,49	7,63	7,58	6,48	6,86	6,44
Aox4	aldehyde oxidase 4	-1,77	6,37	5,55	6,4	6,3	6,41	5,53	5,57	5,56
Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, Nurr1	-1,73	7,73	6,94	8,1	7,08	8,01	6,85	6,97	7
Prg4	proteoglycan 4	-1,72	7,40	6,62	7,5	7,45	7,24	6,45	6,76	6,65
Spp1	secreted phosphoprotein1	-1,71	7,04	6,27	7,1	7,21	6,8	5,9	6,63	6,27
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	-1,69	6,51	5,74	6,56	6,21	6,75	5,22	5,93	6,08
Ptprz1	protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1	-1,55	7,31	6,68	7,35	7,18	7,41	6,49	6,95	6,6
Ntn4	netrin 4;beta-netrin;netrin-4	-1,52	8,65	8,05	8,63	8,6	8,73	7,74	8,21	8,2
Mir329	microRNA 329	-1,52	6,66	6,06	6,53	6,85	6,61	6,26	6,11	5,81
Pcsk6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	1,54	10,13	10,75	10	10,3	10,1	10,9	10,6	10,8
Abca6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	1,58	7,24	7,91	7,23	7,25	7,25	7,53	8,18	8,01
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	1,59	7,65	8,32	7,54	7,65	7,77	8,17	8,51	8,29
Rny1	RNA, Y1 small cytoplasmic, Ro-associated	1,62	7,29	7,99	7,17	7,07	7,64	8,04	7,79	8,14
Sectm1b	secreted and transmembrane protein 1B	1,64	6,43	7,15	6,46	6,22	6,62	6,87	7,41	7,17
Lgr5	leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5	1,68	6,80	7,55	6,62	6,79	7	7,25	7,95	7,46
Hist1h1a	histone cluster 1, H1a	1,71	8,90	9,67	8,75	8,73	9,21	9,6	9,6	9,8
Adora1	adenosine A1 receptor	1,75	7,03	7,84	6,9	7,46	6,74	7,84	7,74	7,94
Mir101c	microRNA 101c	2,00	6,66	7,67	6,89	6,51	6,59	7,76	8,01	7,23
Tdg;Gm9855	thymine-DNA glycosylase;thymine DNA glycosylase pseudogene	4,47	6,37	8,53	6,43	6,37	6,3	8,55	8,56	8,47

Figure 43 : Gènes différentiellement régulés entre l'ovaire WT et l'ovaire KO *Amh*. Pour une meilleure lecture, les gènes différentiellement régulés dans l'ovaire KO *Amh* ont été synthétisés dans ce tableau. Les facteurs de régulation (fold) sont notés en rouge pour les transcrits régulés positivement et en bleu pour ceux régulés négativement dans l'ovaire KO *Amh*. On peut prendre l'exemple de l'*Amh* qui est 23,59 fois moins exprimée dans l'ovaire KO. Les intensités d'expression moyennes sont notées dans les colonnes WT et KO.

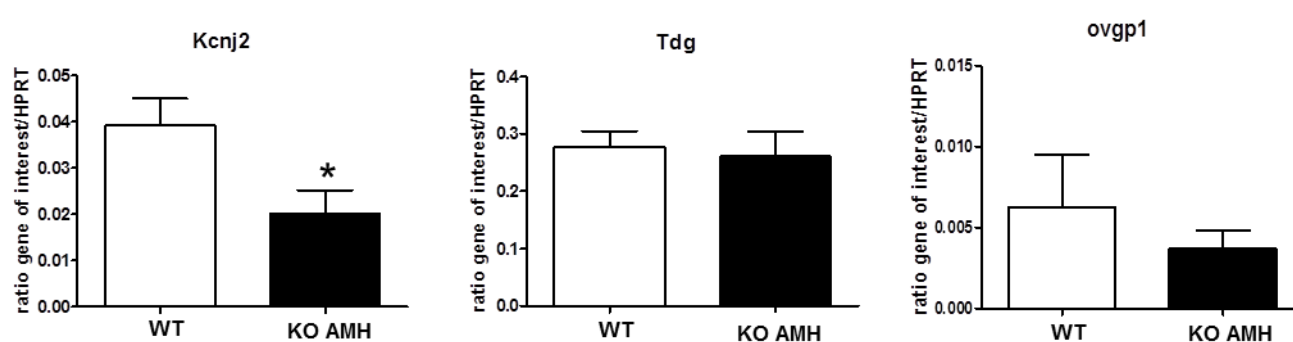


Figure 44 : Validation des résultats par q-PCR. 8 nouveaux échantillons d'ovaire WT et KO pour l'*Amh* ont été prélevés. L'expression des gènes *Kcnj2*, *Tdg* et *Ovgp1* a été analysée par q-PCR. On observe une diminution significative de l'expression de *Kcnj2* dans les ovaires KO *Amh* et une tendance à la diminution pour *Ovgp1*. En revanche, l'expression de *Tdg* ne présente aucune variation. (n=8)

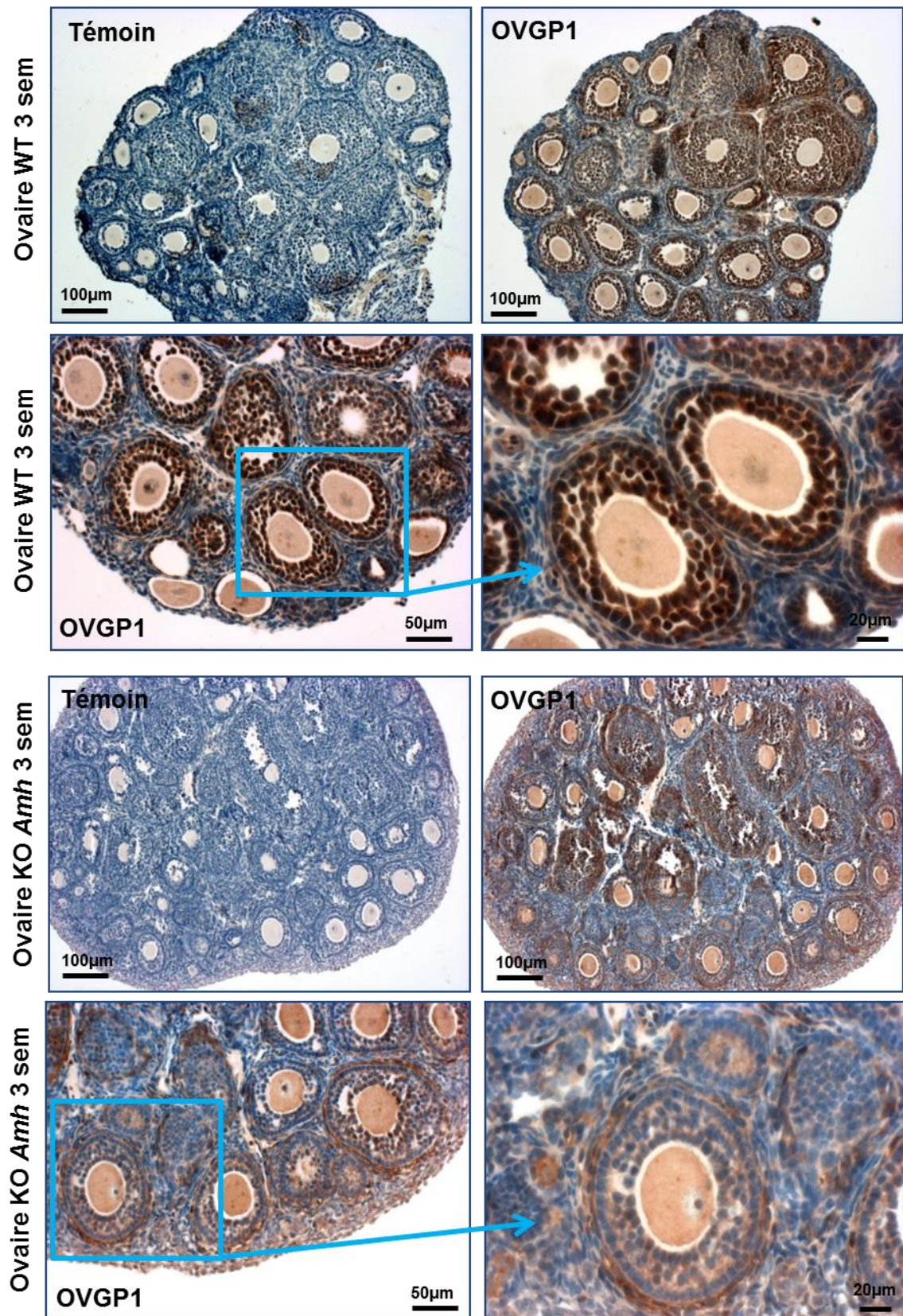


Figure 45 : Localisation de la protéine OVGP1 dans l'ovaire de 3 semaines par immunohistochimie

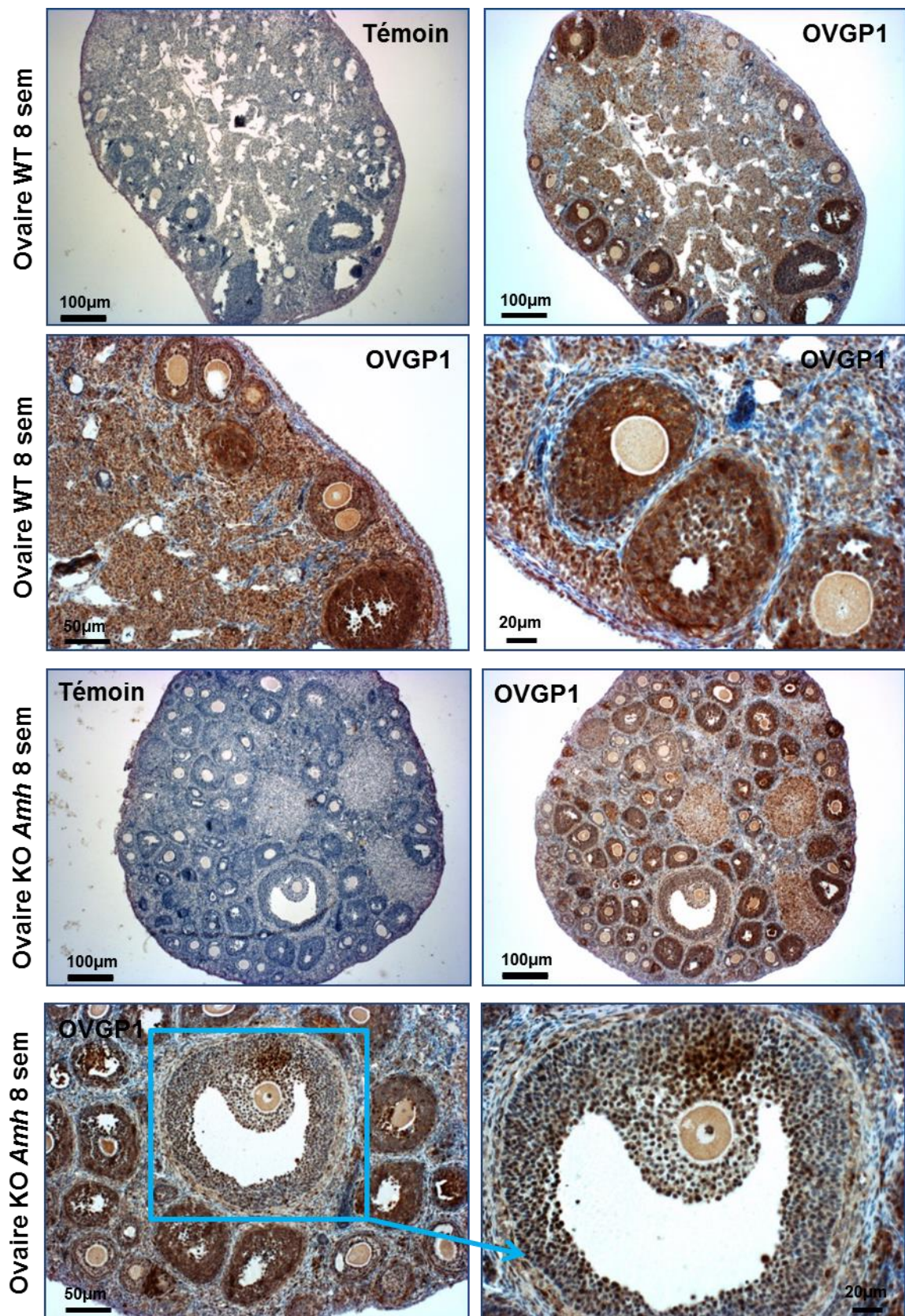


Figure 46 : Localisation de la protéine OVGP1 dans l'ovaire de 8 semaines par immunohistochimie

	follicules primordiaux		follicules primaires		follicules secondaires			Petits follicules antraux			Grands follicules antraux			Corps jaunes
	OV	GC	OV	GC	OV	GC	TC	OV	GC	TC	OV	GC	TC	LC
WT ovaire 3 semaines	+	+	-	+++	-	+++	+	-	+++	+	-	+++	+	
KO AMH ovaire 3 semaines	-	-	-	++	-	++	++	-	++	++	-	++	++	
WT ovaire 8 semaines	+	+	+	+++	+	+++	+++	-	++++	++	-	++++	++	+++
KO AMH ovaire 8 semaines	+	+	+	++	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	++

Tableau 11 : Synthèse de l'expression de la protéine OVGP1 dans les différentes cellules folliculaires. Les lames d'immunohistochimies ont été comparées pour pouvoir définir un niveau d'expression d'OVGP1 dans les différents follicules. J'ai réalisé l'expérience sur 3 ovaires différents de chaque catégorie. (n=3)

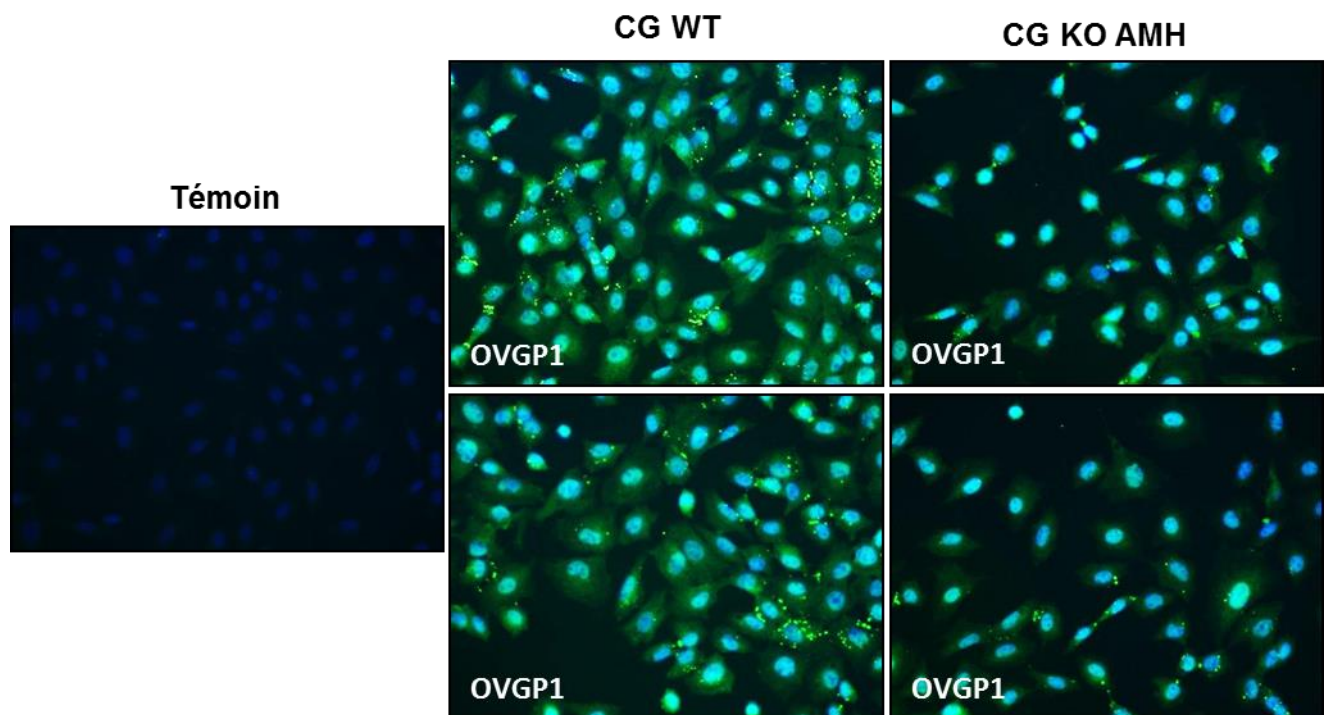
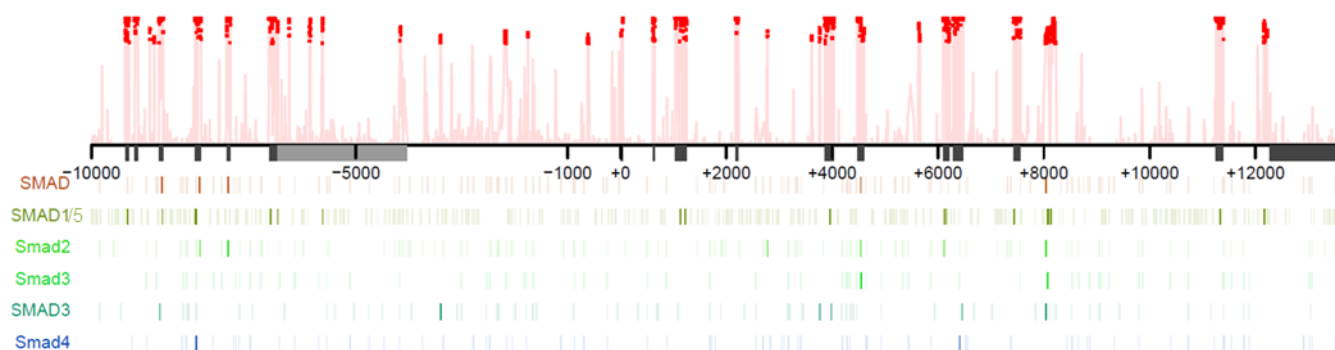


Figure 47 : Expression de la protéine OVGP1 dans les cellules de la granulosa (CG). Pour valider l'expression d'OVGP1 dans les cellules de la granulosa, j'ai réalisé une immunocytochimie sur des CG isolées à partir d'un ovaire WT et d'un ovaire KO *Amh*. L'expression d'OVGP1 semble plus faible dans les CG KO *Amh*. (n=1)

A

Ovgp1 (NM_007696), chr3 (+), 105776720



B

Kcnj2 (NM_008425), chr11 (+), 110927478

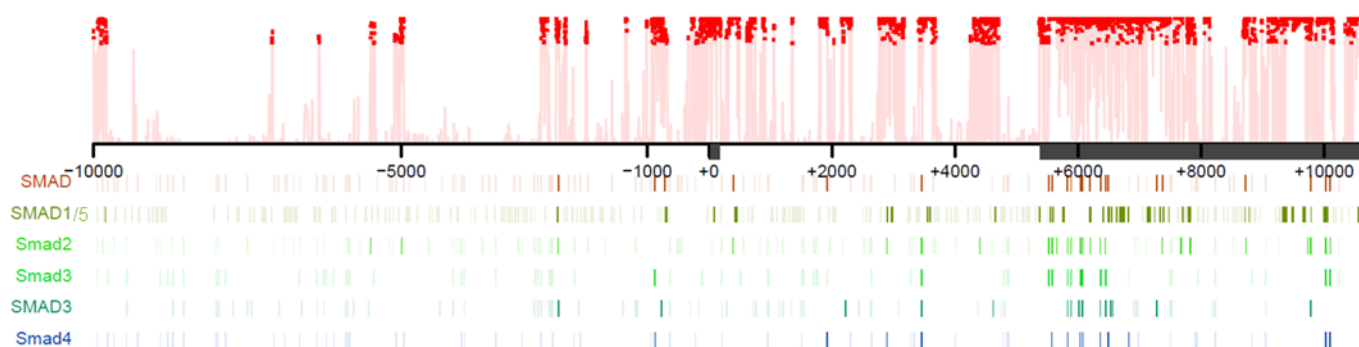


Figure 48 : Régulation de l'expression des gènes *Ovgp1* et *Kcnj2* par les Smad: Recherche de Smad Binding Element (SBE). La recherche de SBE a été effectuée sur une région allant de -10 kb à +10 kb pb par rapport au site d'initiation de la transcription des gènes *Ovgp1* et *Kcnj2*. Les boîtes grises correspondent aux exons.

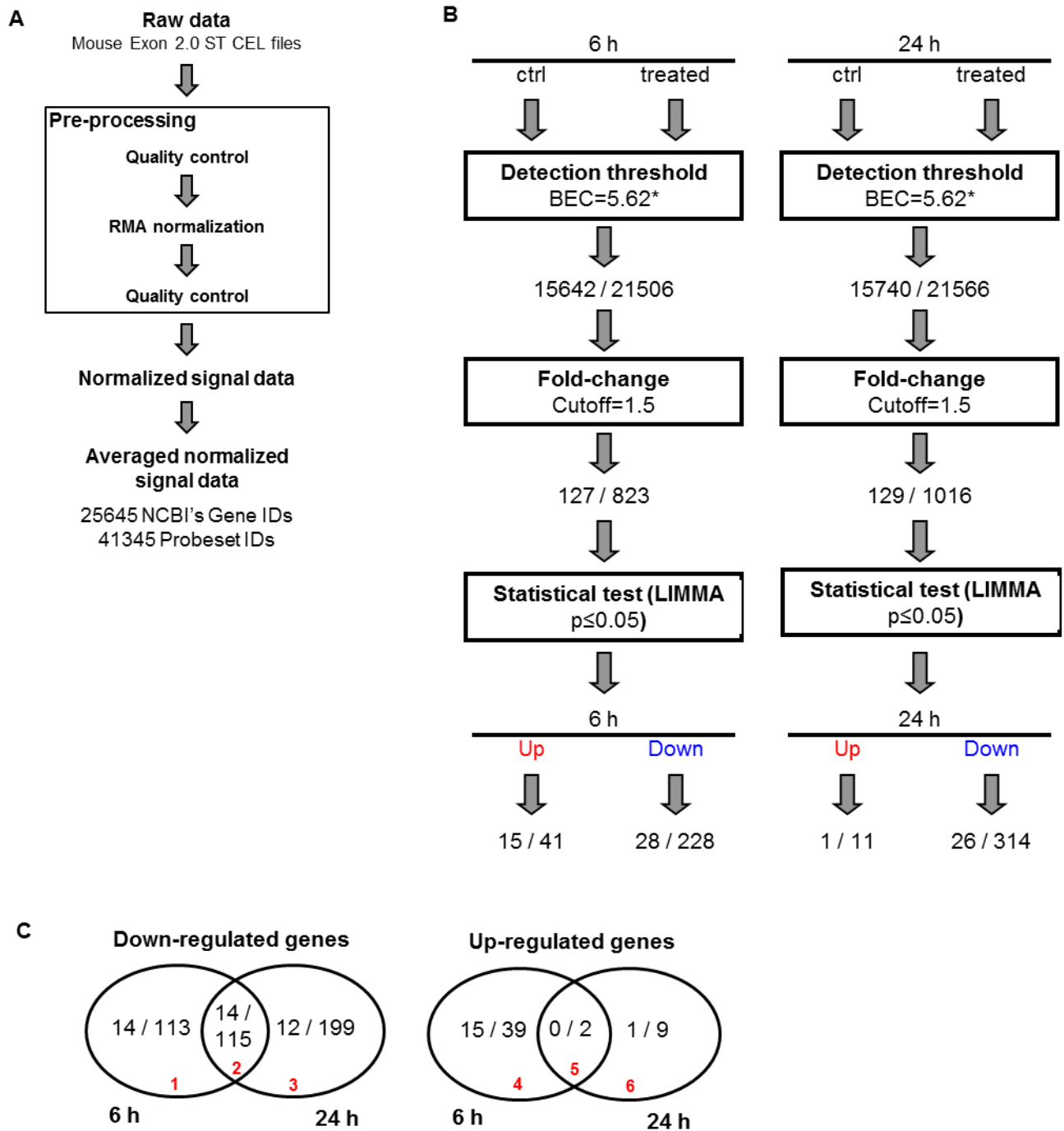


Figure 49: Stratégie de filtration des données. A : Normalisation des données brutes B : Sélection des transcrits par comparaison des données des CG contrôle ou exposées à de l'AMH pendant 6 h ou 24 h. Le nombre de transcrits et de probeset est donné à chaque étape de filtration. Deux comparaisons ont été réalisées. On obtient 127 transcrits différentiellement régulés après une exposition à de l'AMH pendant 6 h et 129 après une exposition à de l'AMH pendant 24 h. Pour chaque comparaison, les transcrits ont été classés en deux groupes: les transcrits régulés positivement (up) et négativement (down) après exposition à l'AMH. C : Les transcrits obtenus ont été croisés pour détecter ceux différentiellement régulés dans les deux comparaisons. On peut noter que 14 transcrits sont régulés négativement après 6 h et à 24 h de traitement à l'AMH.

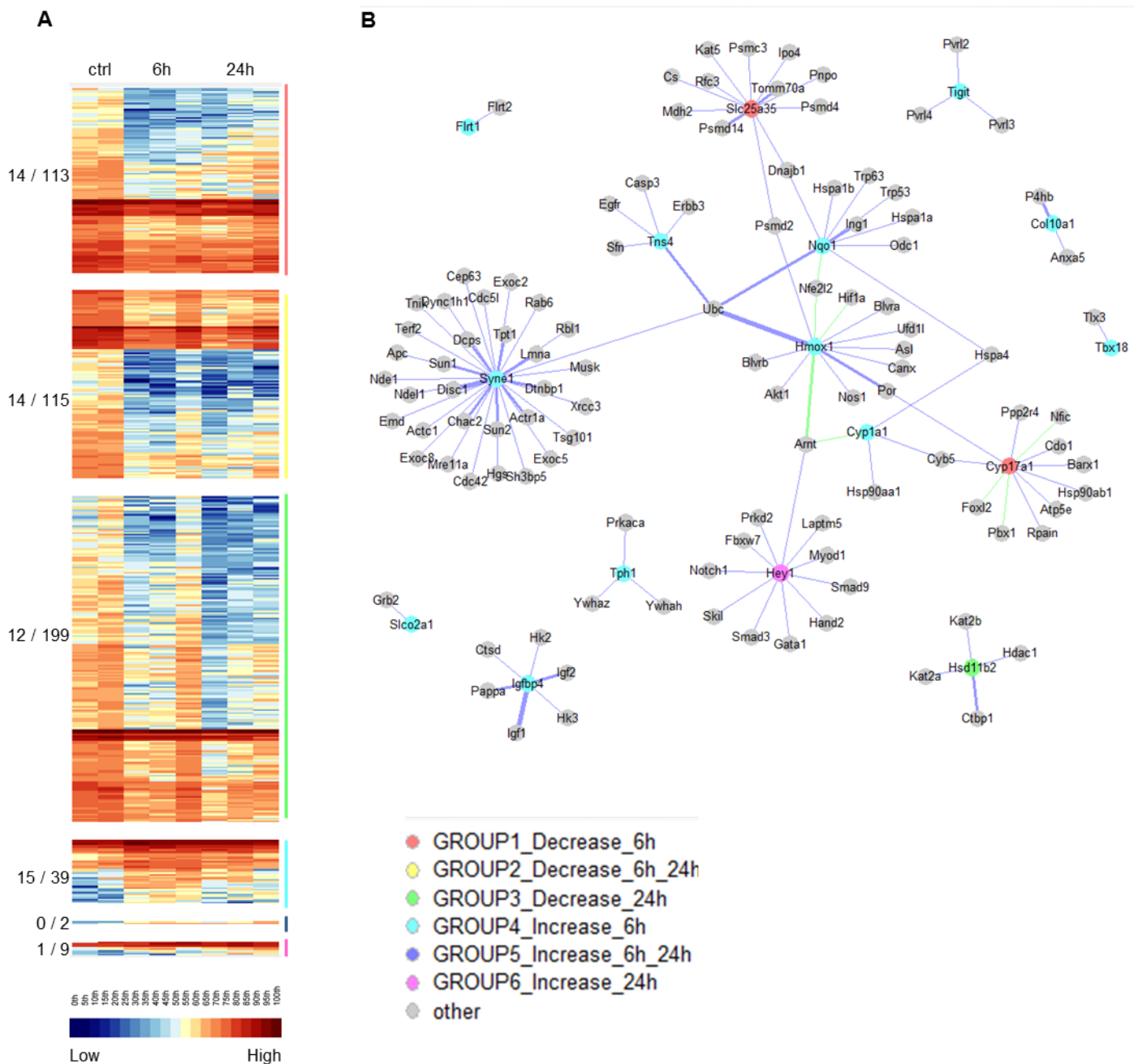


Figure 50 : Expression différentielle des transcrits après une exposition de 6 h ou de 24 h à de l'AMH. A. La carte des chaleurs (heatmap) représente l'intensité d'expression de chaque transcrit selon l'échelle de couleur présentée sous cette carte. Le bleu représente les transcrits peu ou pas exprimés et le rouge correspond à une forte expression transcriptionnelle. B : Analyse du réseau d'interactions protéiques des transcrits dérégulés après une exposition à de l'AMH. Les différentes couleurs représentent les différents sous-groupes de transcrits.

		Fold 6h	fold 24h	CG-	CG 6h	CG 24h	CG1	CG2	CG 6h 1	CG 6h 2	CG 6h 3	CG 24h 1	CG 24h 2	CG 24h 3
Tns4	tensin 4	2,13	1,27	5,94	7,02	6,28	5,84	6,03	6,93	7,03	7,11	6,26	6,45	6,14
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a	2,13	1,07	5,18	6,27	5,28	5,09	5,27	6,5	6,25	6,05	5,41	5,24	5,18
Tigit	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	2,08	1,25	5,27	6,33	5,59	4,96	5,57	6,21	6,36	6,41	5,56	5,68	5,53
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	2,07	1,28	9,45	10,49	9,81	9,47	9,42	10,6	10,49	10,3	9,85	9,85	9,72
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	2,01	-1,04	6,64	7,65	6,59	6,55	6,73	7,62	7,52	7,82	6,81	6,58	6,39
Firt1	fibronectin leucine rich transmembrane protein 1	1,98	1,04	6,60	7,58	6,66	6,82	6,38	7,74	7,53	7,48	6,87	6,64	6,46
Fabp7	fatty acid binding protein 7	1,92	1,60	9,30	10,24	9,97	9,29	9,3	10,2	10,15	10,2	10,09	9,92	9,9
Sprr1a	small proline-rich protein 1A	1,86	-1,03	6,61	7,51	6,57	6,43	6,79	7,6	7,62	7,3	6,71	6,73	6,26
Tmem178	transmembrane protein 178	1,83	1,77	7,21	8,08	8,03	7,33	7,08	8,42	7,73	8,08	8,42	8,07	7,6
Syne1	synaptic nuclear envelope 1	1,82	1,24	5,55	6,41	5,85	5,62	5,47	6,23	6,66	6,33	5,86	6,06	5,64
Tbx18	T-box transcription factor TBX18	1,74	1,46	7,13	7,93	7,67	6,93	7,33	7,87	7,92	7,99	7,56	7,9	7,56
Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1	1,72	1,02	9,63	10,41	9,65	9,67	9,58	10,6	10,31	10,2	9,93	9,65	9,37
Tph1	tryptophan hydroxylase 1	1,72	-1,12	6,80	7,58	6,64	6,44	7,16	7,47	7,6	7,68	6,53	6,84	6,56
Slco2a1	solute carrier organic anion transporter family, member 2a1	1,71	1,19	8,28	9,05	8,52	8,32	8,23	9,1	9,1	8,95	8,53	8,59	8,45
Col10a1	collagen, type X, alpha 1	1,68	1,14	7,00	7,75	7,19	7,15	6,85	7,87	7,7	7,67	7,22	7,22	7,12
Hey1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	1,59	1,9	7,97	8,63	8,89	7,97	7,96	8,67	8,71	8,52	8,96	9,09	8,62
Mirlet7e	microRNA let7e	-1,19	-1,94	6,80	6,55	5,84	6,84	6,76	6,4	6,37	6,88	5,47	6,11	5,94
Speer4b	spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 4b	-1,35	-2,01	6,55	6,12	5,54	6,58	6,52	5,79	6,03	6,53	5,33	5,55	5,73
Hsd11b2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2	-1,61	-1,87	9,93	9,24	9,03	9,85	10,0	9,11	9,55	9,06	8,97	9,14	8,97
Cyp17a1	cytochrome P450, family 17	-1,64	-1,69	5,77	5,06	5,01	5,67	5,87	4,97	5,08	5,13	4,88	5,15	5,01
Mir99a	microRNA 99a	-1,66	-1,97	7,45	6,72	6,47	7,31	7,58	6,36	6,77	7,03	5,8	6,55	7,05
Mirlet7c-1	microRNA let7c-1	-1,72	-2,62	6,60	5,82	5,21	6,39	6,81	5,44	5,93	6,08	4,41	5,16	6,06
Slc25a35	solute carrier family 25, member 35	-1,77	-1,21	9,01	8,19	8,74	9,09	8,93	8,18	8,27	8,11	8,89	8,7	8,64
Ppnr	per-pentamer repeat gene	-1,8	-1,74	5,72	4,86	4,92	5,58	5,85	4,55	4,66	5,38	4,72	4,78	5,26
Mir1898	microRNA 1898	-1,84	-1,89	7,59	6,71	6,67	7,51	7,66	6,02	6,63	7,48	6,1	6,78	7,13
Mir1967	microRNA 1967	-1,87	-1,25	5,72	4,82	5,40	5,55	5,88	5,1	4,44	4,91	5,21	5,42	5,57
Mir505	microRNA 505	-2,01	-1,96	8,33	7,32	7,36	8,22	8,44	6,75	7,26	7,96	6,56	7,14	8,38
Mir691	microRNA 691	-2,01	-2,41	7,23	6,22	5,96	7,03	7,43	5,99	5,86	6,81	5,37	5,92	6,6
Mir701	microRNA 701	-2,06	-2,19	6,48	5,44	5,35	6,33	6,62	5,22	5,11	5,98	4,96	5,1	5,99
Phxr4	per-hexamer repeat gene 4	-2,08	-2,36	7,06	6,00	5,82	6,96	7,16	5,54	5,76	6,71	5,04	5,98	6,43

Figure 51 : Gènes différentiellement régulés après une exposition de 6 h ou de 24 h à l'AMH. Pour une meilleure lecture, les gènes différentiellement régulés après une exposition à l'AMH ont été synthétisés dans ce tableau. Les facteurs de régulation (fold) sont notés en rouge pour les transcrits régulés positivement et en bleu pour ceux régulés négativement dans les différentes conditions. Les intensités d'expression moyennes sont notées dans les colonnes CG-, CG 6 h et CG 24 h.

III Expression et rôle de l'AMH dans l'utérus

1 Introduction

La dernière partie de mon projet visait à déterminer un rôle potentiel de l'AMH dans l'utérus. En effet, le récepteur de l'AMH est exprimé dans le myomètre utérin chez la souris adulte (Arango, Kobayashi et al. 2008) et dans l'endomètre humain (Wang, Dicken et al. 2009). L'AMH pourrait donc agir sur cet organe via AMHR-II et réguler certains gènes impliqués dans la fonction utérine de l'animal. La présence du récepteur dans le myomètre pourrait indiquer un rôle de l'AMH sur les contractions myométriales en fin de gestation. C'est la piste que nous avons voulu explorer. Je me suis d'abord intéressée à l'expression de l'AMH dans l'utérus murin. En effet, une production intrinsèque dans l'organe favoriserait l'action de cette hormone. Cependant, l'AMH exprimée par les follicules ovariens en croissance peut également atteindre l'utérus par voie sanguine et agir sur celui-ci. A l'heure actuelle, une seule étude s'est intéressée à l'expression de l'AMH dans l'utérus humain (Wang, Dicken et al. 2009). Il a été montré que l'AMH est exprimée dans l'endomètre et que cette expression est augmentée par les oestrogènes et la progestérone. De plus, actuellement, aucun gène cible de l'AMH n'a été décrit dans l'utérus ce qui empêche de déterminer un potentiel rôle de cette hormone. Avec la technique de macro-array, nous avons pu mettre en évidence de nombreux gènes dérégulés dans l'utérus KO *Amh*. Ceci indique que l'absence de production d'AMH perturbe l'expression de certains gènes. L'AMH pourrait donc avoir une action sur la régulation de la fonction utérine.

2 Matériels et Méthodes

Pour analyser l'expression de l'*Amh* dans l'utérus nous avons réalisé une PCR et une q-PCR sur des échantillons d'utérus à différents stades de la gestation. L'utérus non gravide a été prélevé après accouplement et visualisation du bouchon. On considère que ces échantillons utérins sont à 0,5 jpc. Des échantillons ont également été prélevés à 10,5 jpc, 17,5 jpc et 19,5 jpc. Nous avons également cherché à détecter la présence de la protéine dans l'utérus non gravide par Western blot et à la localiser par immunohistochimie. Pour déterminer le rôle potentiel de l'AMH nous avons analysé les gènes différentiellement exprimés entre l'utérus non gravide WT et KO pour l'*Amh* à 8 semaines par macro-array (RT²

profiler PCR array). Les gènes intéressants pour notre étude ont ensuite été validés par q-PCR sur de nouveaux échantillons. L'ensemble des protocoles de ces expériences est détaillé dans le chapitre matériels et méthodes de ce manuscrit.

3 Résultats

3.1 Expression de l'AMH dans l'utérus

On observe l'expression de l'*Amh* en PCR dans l'utérus à 0,5 jpc (figure 52 A). Cette expression n'est plus détectable à 10,5 jpc. Un échantillon de cellules de la granulosa (CG) a été utilisé comme témoin positif (figure 52 A). L'analyse par PCR a été complétée par une q-PCR (figure 52 B). Des échantillons d'utérus à différents stades de gestation ont été testés. Bien que faible, on observe une expression de l'*Amh* à 0,5 jpc. Cette expression chute entre 0,5 et 10,5 jpc et l'*Amh* n'est alors que très faiblement détectée. Jusqu'à la fin de la gestation, l'expression restera faible (figure 52 B). Nous avons ensuite analysé l'expression de la protéine en Western blot (figure 52 C). L'ovaire est utilisé comme témoin positif et on observe une bande correspondant à l'AMH. En revanche, on ne détecte pas de bande pour l'échantillon utérin.

Nous avons en parallèle, utilisé la technique d'immunofluorescence pour localiser l'AMH au sein du tractus génital féminin. Nous avons validé nos conditions en utilisant cette technique sur de l'ovaire de 3 semaines (figure 53 panel du haut). L'AMH est exprimée, comme attendu, dans les petits follicules en croissance. Nous avons également voulu vérifier l'expression de l'AMH dans l'oviducte (figure 53 panel du bas) où elle ne semble pas exprimée. Enfin, nous avons cherché à localiser l'expression de l'AMH dans l'utérus murin de 8 semaines à 0,5 jpc. Les souris KO pour l'*Amh* ont été utilisées comme contrôles (figure 54 A). Les résultats obtenus en immunofluorescence sont discutables. En effet, on observe des variations de signal de l'AMH en fonction des échantillons utérins analysés (figure 54 B, C et D). Certaines expériences montreraient un signal, plus ou moins fort, dans l'endomètre (figure 54 B et C) alors qu'une autre indiquerait une expression de l'AMH plutôt au sein du myomètre (figure 54 D).

Le gène de l'*Amh* est donc faiblement exprimé dans l'utérus mais l'expression et la localisation de la protéine restent encore à définir.

3.2 Gènes dérégulés dans l'utérus KO *Amh*

La technique de macro-array a permis de comparer 84 gènes relatifs aux voies de signalisations du TGF- β et des BMPs. Nous avons analysé la variation d'expression de ces gènes entre des échantillons utérins de 8 semaines WT à 0,5 jpc et des échantillons utérins KO pour l'*Amh* au même stade. Les gènes différentiellement régulés sont présentés dans la figure 55. On note 15 gènes régulés positivement et 10 gènes régulés négativement d'un facteur d'au moins 2. Cette expérience est intéressante car elle montre que l'AMH semble jouer un rôle sur la régulation d'un certain nombre de gènes dans l'utérus qu'elle soit exprimée ou non dans cet organe. L'AMH produite au sein de l'ovaire ou de l'utérus (ou les deux) serait capable d'agir sur l'utérus.

Nous avons voulu valider certains gènes en q-PCR sur de nouveaux échantillons utérins WT et KO pour l'*Amh* (figure 56). Parmi ces gènes, nous avons choisi de valider l'*Inha* qui présentait le plus gros différentiel d'expression entre les échantillons utérins WT et KO *Amh*. Nous nous sommes également intéressés aux gènes *Id1* et *Id3* que nous avons déjà étudié dans les CG en tant que gènes cibles de l'AMH (Sedes, Leclerc et al. 2013). Pour finir le gène *Junb* semblait être un candidat intéressant car il a été montré chez le rat que ce gène intervient dans la survenue des contractions myométriales (Mitchell and Lye 2002). Bien que les résultats ne soient pas significatifs, les tendances observées pour les gènes *Inha*, *Id1* et *Junb* sont celles attendues et confirment les résultats du macro-array. *Inha* semble régulé positivement dans les utéri KO *Amh* et les gènes *Id1* et *Junb* semblent régulés négativement. Nous avons également vérifié l'expression du gène *Id3* que nous avons identifié comme gène cible de l'AMH dans les CG et il semble régulé négativement dans les utéri KO *Amh* (figure 56).

Le récepteur de l'AMH étant exprimé sur les cellules du myomètre, nous avons émis l'hypothèse d'une action de cette hormone sur la survenue des contractions myométriales au moment du travail. Chez le rat, les facteurs de la famille AP1 dont fait partie JUNB sont importants pour la survenue des contractions myométriales (Mitchell and Lye 2002). Nous avons testé par q-PCR sur des échantillons d'utéri WT et KO pour l'*Amh* l'expression de l'ensemble des gènes codant pour les protéines de la famille AP1, *c-Fos*, *fosB*, *Fra-1*, *Fra-2*, *Junb* et *Jund* (données non montrées). Aucun de ces gènes ne présente de variation d'expression à l'exception de *Junb*. Il a été montré que l'expression des gènes codant pour les

protéines de la famille AP1 augmente le jour de la parturition chez le rat (Mitchell and Lye 2002). Nous avons donc cherché à savoir si l'expression de *Junb* variait au cours de la gestation par q-PCR (figure 57). *Junb* est exprimé dans l'utérus à 0,5 jpc. On observe une importante diminution de son expression entre 0,5 jpc et 10,5 jpc. Cette expression reste basse jusqu'à 19,5 jpc (figure 57).

4 Discussion

Une seule étude s'est jusque-là intéressée à l'expression de l'AMH dans l'utérus. Elle montre que cette hormone est exprimée dans l'endomètre humain (Wang, Dicken et al. 2009). Nous avons montré que l'expression du gène de l'*Amh* est détectable dans l'utérus murin dans certaines conditions. Les résultats obtenus sur l'expression de la protéine restent à confirmer. En effet, le western blot n'a été réalisé qu'une seule fois et la protéine ne semble pas détectable dans l'utérus entier. De plus, plusieurs expériences d'immunohistochimies ont été réalisées et les résultats ne sont pas clairs quant à l'expression et la localisation de la protéine. Il serait donc intéressant d'isoler les cellules de l'endomètre d'une part et du myomètre d'autre part pour enrichir les différentes fractions utérines et augmenter les chances d'observer la protéine en immunocytochimie et en Western blot.

L'expérience de macro-array a permis de mettre en évidence de nombreux gènes des voies des BMPs et du TGF- β dérégulés dans l'utérus KO *Amh*. L'AMH, à première vue, ne semble pas ou peu produite dans l'utérus, on peut supposer que l'AMH produite au niveau de l'ovaire peut agir sur la régulation de certains gènes utérins. Celle-ci pourrait se lier à son récepteur spécifique situé au niveau du myomètre dans le cas de la souris (Arango, Kobayashi et al. 2008).

Aucune donnée n'est disponible sur les potentiels rôles physiologiques de l'AMH dans l'utérus. Nous avons choisi d'explorer l'hypothèse d'une action sur la contractilité myométriale au moment de la parturition. Bien que les souris KO *Amh* donnent naissance à des petits sains, il serait intéressant de comparer la durée de mise bas entre ces souris et des souris contrôles. En effet, si l'AMH joue un rôle au moment de la parturition, les souris KO *Amh* peuvent présenter certains défauts au moment du travail et notamment une mise bas plus longue. Selon cette hypothèse, l'AMH se lierait à son récepteur spécifique AMHR-II et régulerait certains gènes responsables de la survenue des contractions comme le gène *Junb*. La présence de sites de liaison aux Smad sur le promoteur de *Junb* a été démontrée (Jonk, Itoh

et al. 1998). Cette étude précise que ce promoteur peut être régulé par les BMPs. L'AMH pourrait donc potentiellement réguler ce promoteur en activant la voie des Smad.

A 10,5 jpc, l'expression de *Junb* est plus faible qu'à 0.5 jpc. Cette diminution d'expression a donc lieu entre ces deux stades. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer le moment précis de la baisse d'expression de ce gène. L'expression reste faible jusqu'à 19,5 jpc dans l'utérus murin. Nous n'avons pas prélevé d'échantillons utérins pendant le travail, c'est-à-dire après le début des contractions myométriales. L'expression de *Junb* n'augmentant qu'à ce stade dans l'utérus de rat (Mitchell and Lye 2002), il est possible que son expression maintenue basse au cours de la gestation chez la souris augmente au moment du travail. Il serait intéressant de prélever des échantillons précisément au début du travail (entre 19,5 et 21 jpc). L'analyse de l'expression en q-PCR de *Junb* à ce stade, permettrait dans un premier temps de déterminer si ce gène est important pour le déclenchement de la parturition. Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ou de gènes rapporteurs permettraient ensuite d'observer si les protéines Smads sont recrutées au niveau du promoteur de *Junb*.

Les rôles potentiels de l'AMH ne s'arrêtent pas aux contractions myométriales. En effet, une étude récente montre que les niveaux d'AMH circulants diminuent au cours de la grossesse chez la femme (Koninger, Kauth et al. 2013). Si les niveaux d'AMH présentent le même profil chez la souris pendant la gestation, il est possible qu'à l'inverse, l'hormone participe au maintien du myomètre au repos. L'expression de l'AMH diminuerait donc pour que le myomètre puisse se contracter. Il serait intéressant d'isoler des cellules myométriales, de les exposer à de l'AMH et d'analyser le transcriptome de ces cellules pour déterminer les gènes régulés par cette hormone. On pourrait par cette expérience évaluer l'action de l'AMH sur le myomètre et potentiellement définir son rôle de façon plus large.

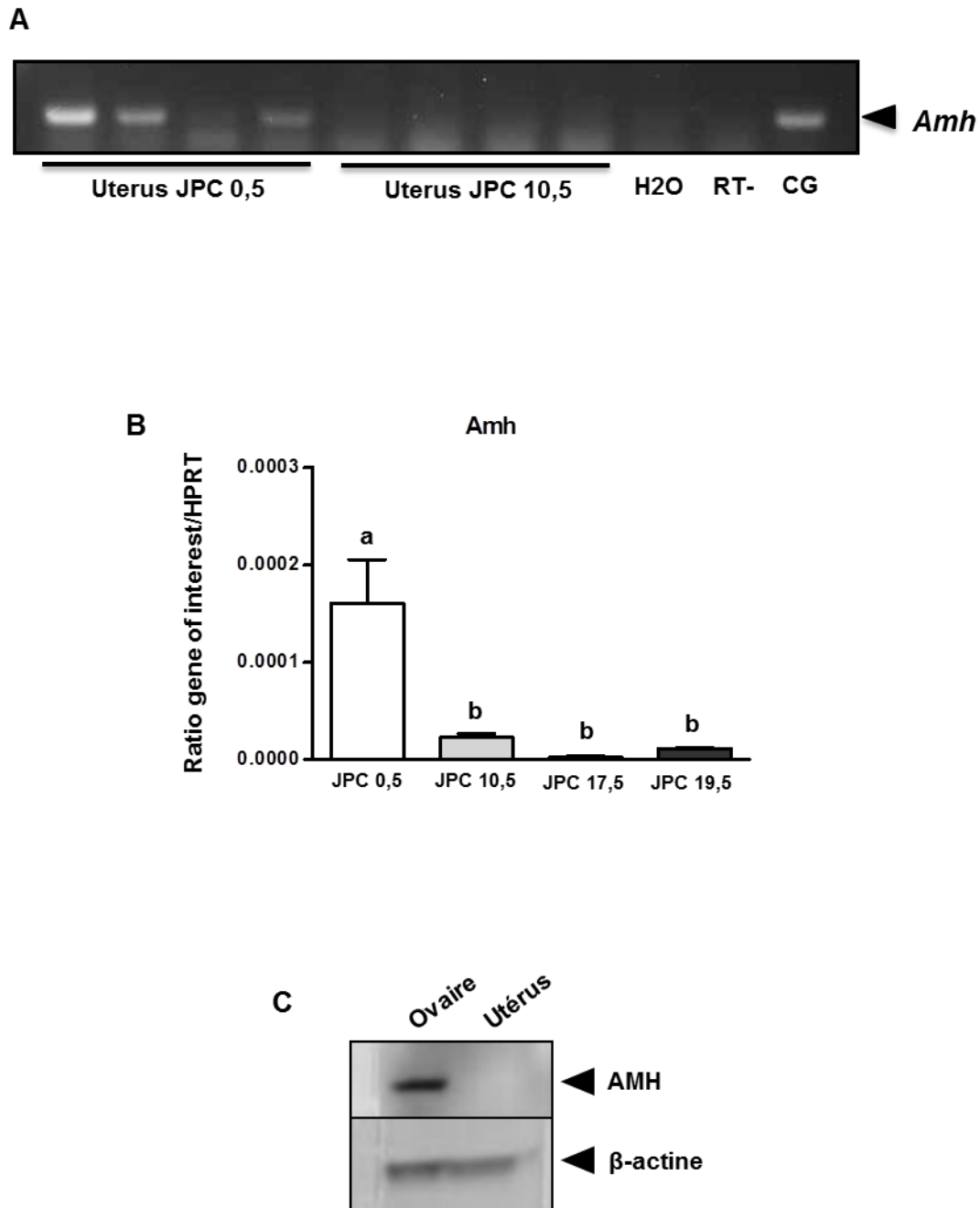


Figure 52: Expression de l'Amh dans l'utérus. A. L'expression de l'Amh a dans un premier temps été évaluée par PCR (35 cycles) dans des échantillons d'utéri à 0,5 jpc et à 10,5 jpc. Un échantillon de CG a servi de témoin positif. B. L'expression de l'Amh a été confirmée par q-PCR sur des échantillons d'utéri à 0,5 jpc, 10,5 jpc, 17,5 jpc et 19,5 jpc. L'expression de l'Amh est détectable mais à un faible niveau dans l'utérus à 0,5 jpc et cette expression diminue au cours de la gestation. C. L'expression de la protéine a été analysée par western blot (n=1). L'ovaire a été utilisé comme témoin positif. L'AMH ne semble pas exprimée dans l'utérus.

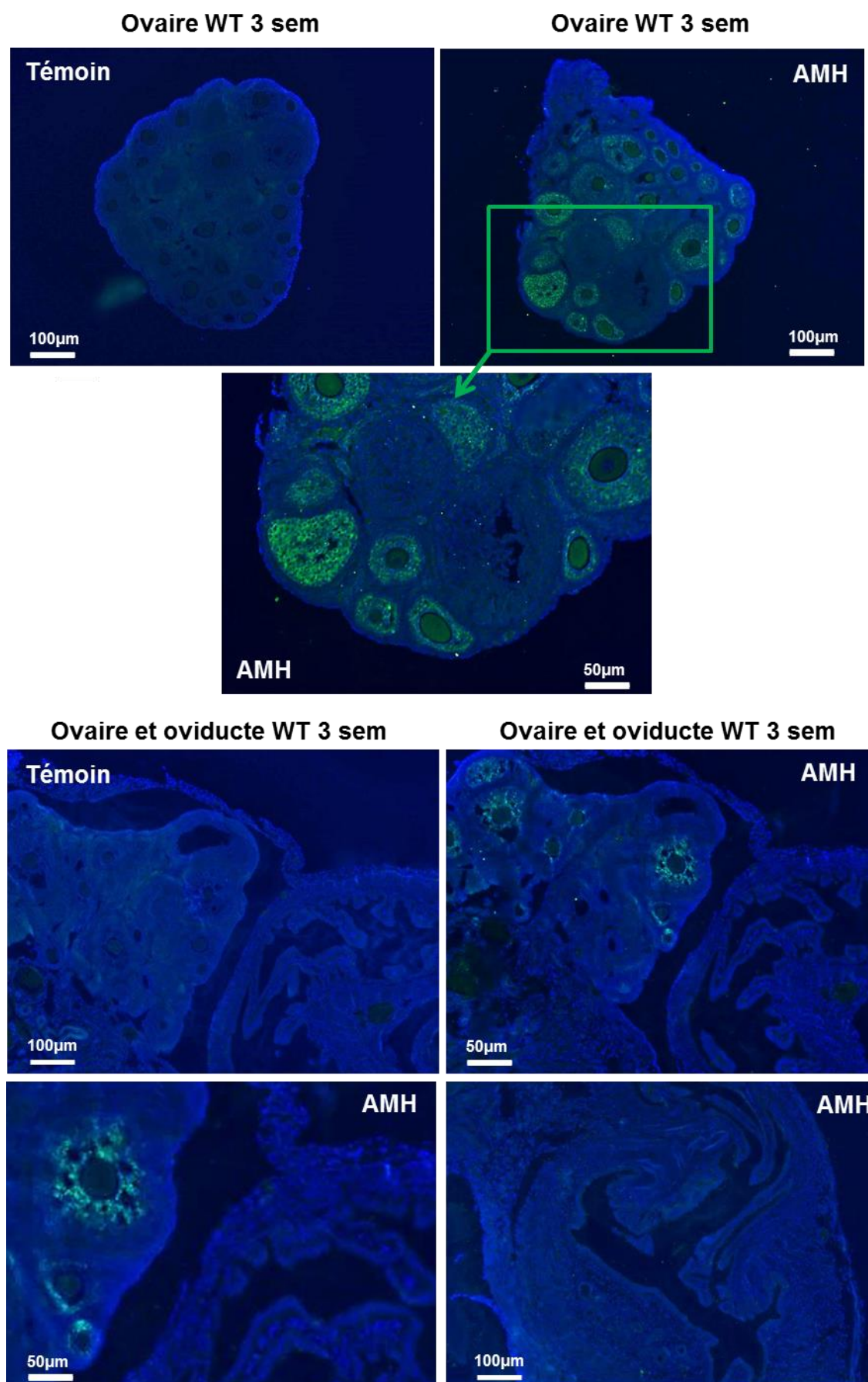


Figure 53: Expression de l'AMH dans l'ovaire et l'oviducte de 3 semaines par immunofluorescence

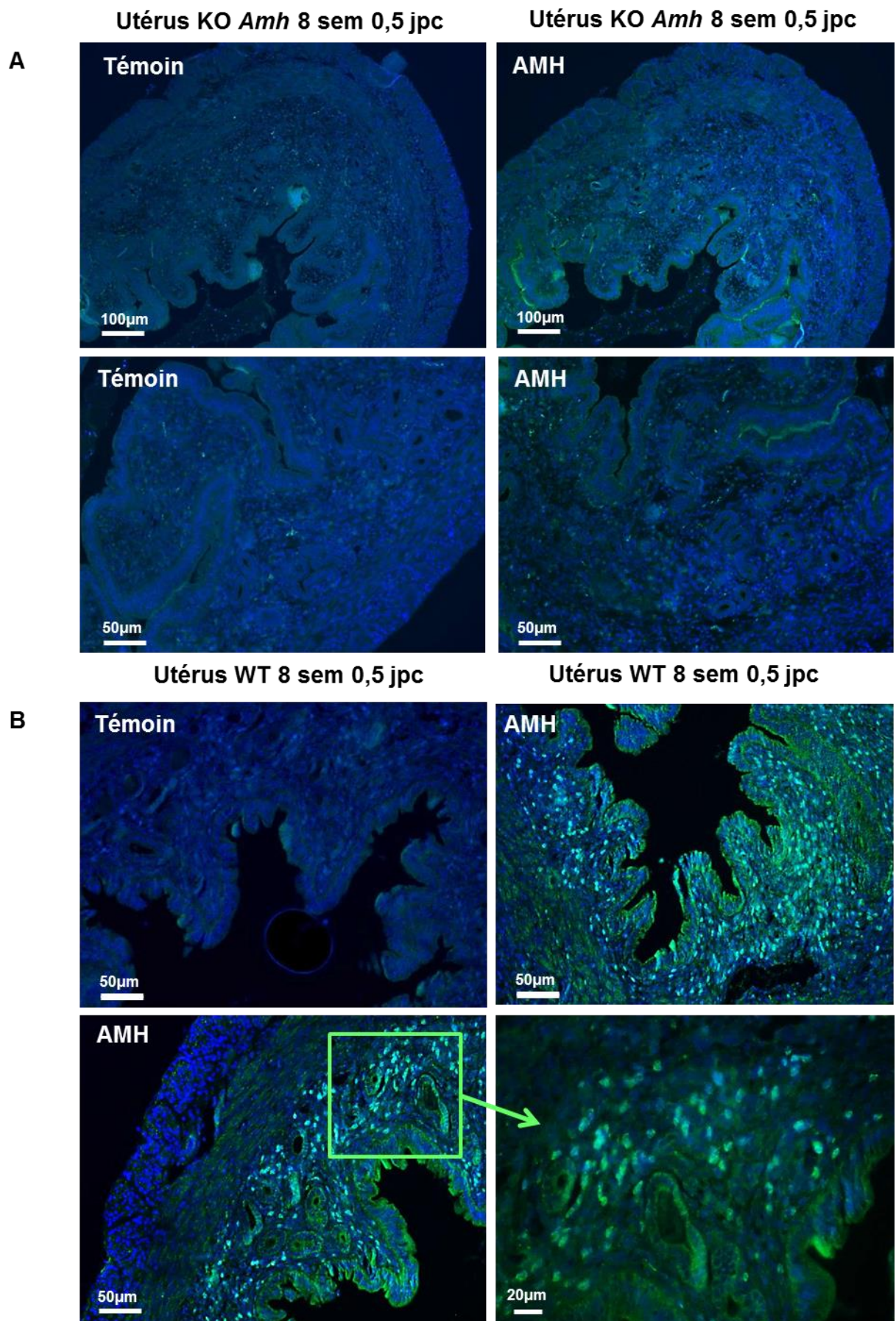


Figure 54: Expression de l'AMH dans l'utérus de 8 semaines à 0,5 jpc par immunofluorescence

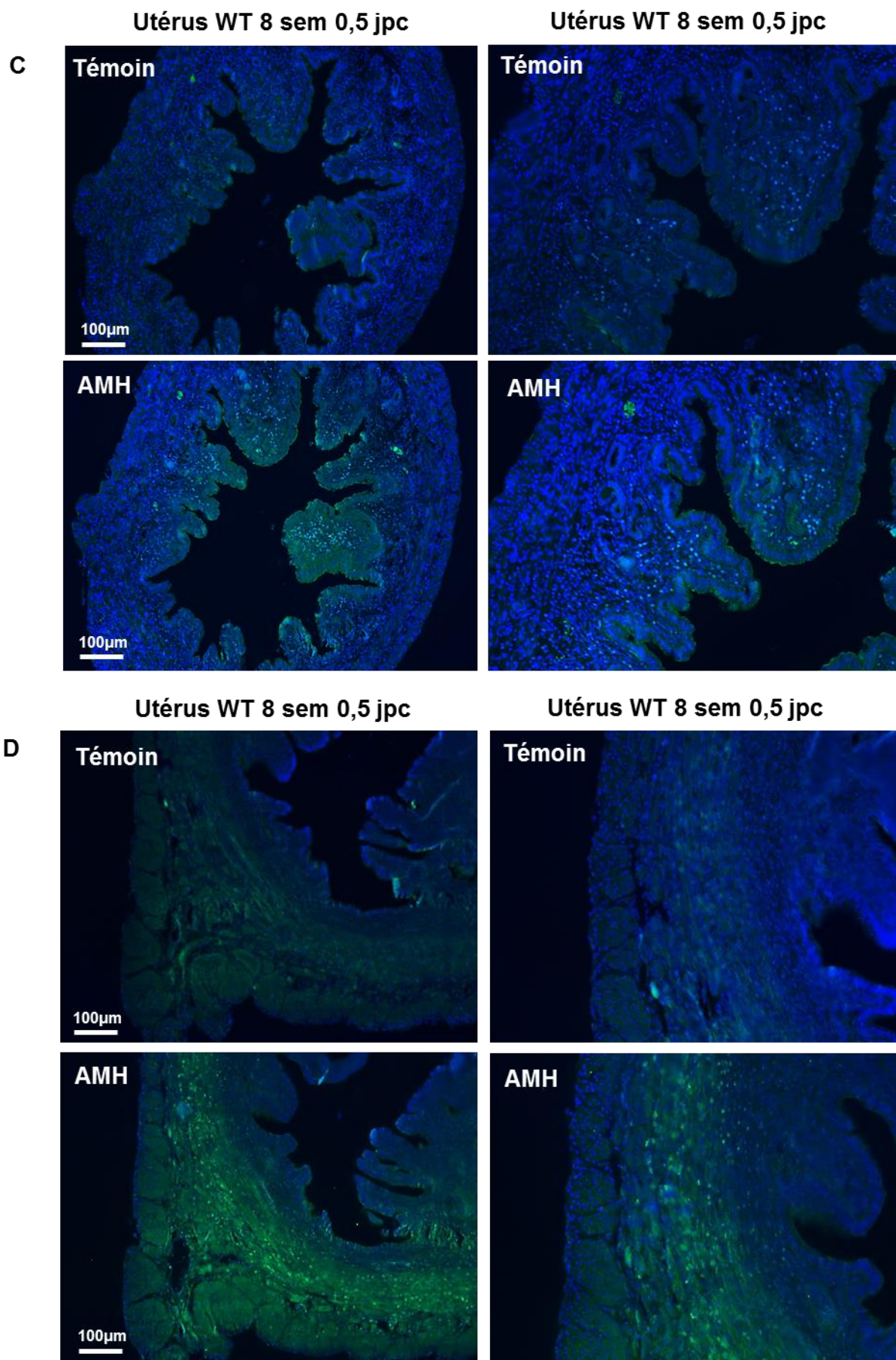


Figure 54 (suite) : Expression de l'AMH dans l'utérus de 8 semaines à 0,5 jpc par immunofluorescence

Gènes	Fold
Inha	4,8
Smurf1	3,5
Nrob1	3,2
Pdgfb	3,1
Inhba	2,6
Gdf6	2,5
Tgfb1	2,4
Dlx2	2,4
Bmp2	2,3
Bmpr1b	2,2
Acvr1	2,1
Tgfb2	2,1
Tgfb	2,1
Ltb2	2
Bmp6	2
Gdf5	-2,1
Nog	-2,1
Ltb1	-2,3
Cdkn1a	-2,4
Bmp7	-2,4
Nbl1	-2,6
Junb	-2,9
Id1	-3,2
Stat1	-3,2
Col3a1	-3,8

Figure 55: Résultats du PCR-array (macro-array): comparaison entre utéri WT et KO *Amh* de 8 semaines à 0,5 jpc. 84 gènes impliqués dans les voies TGF- β /BMP ont été testés par PCR –array. Le protocole est détaillé dans le chapitre matériels et méthodes de ce manuscrit (page 156). Les gènes régulés positivement entre l'utérus WT et KO *Amh* sont représentés en rouge et les gènes régulés négativement en bleu. Les facteurs de régulation (fold) sont notés dans la colonne de droite (n=3).

Utérus WT
 Utérus KO *Amh*

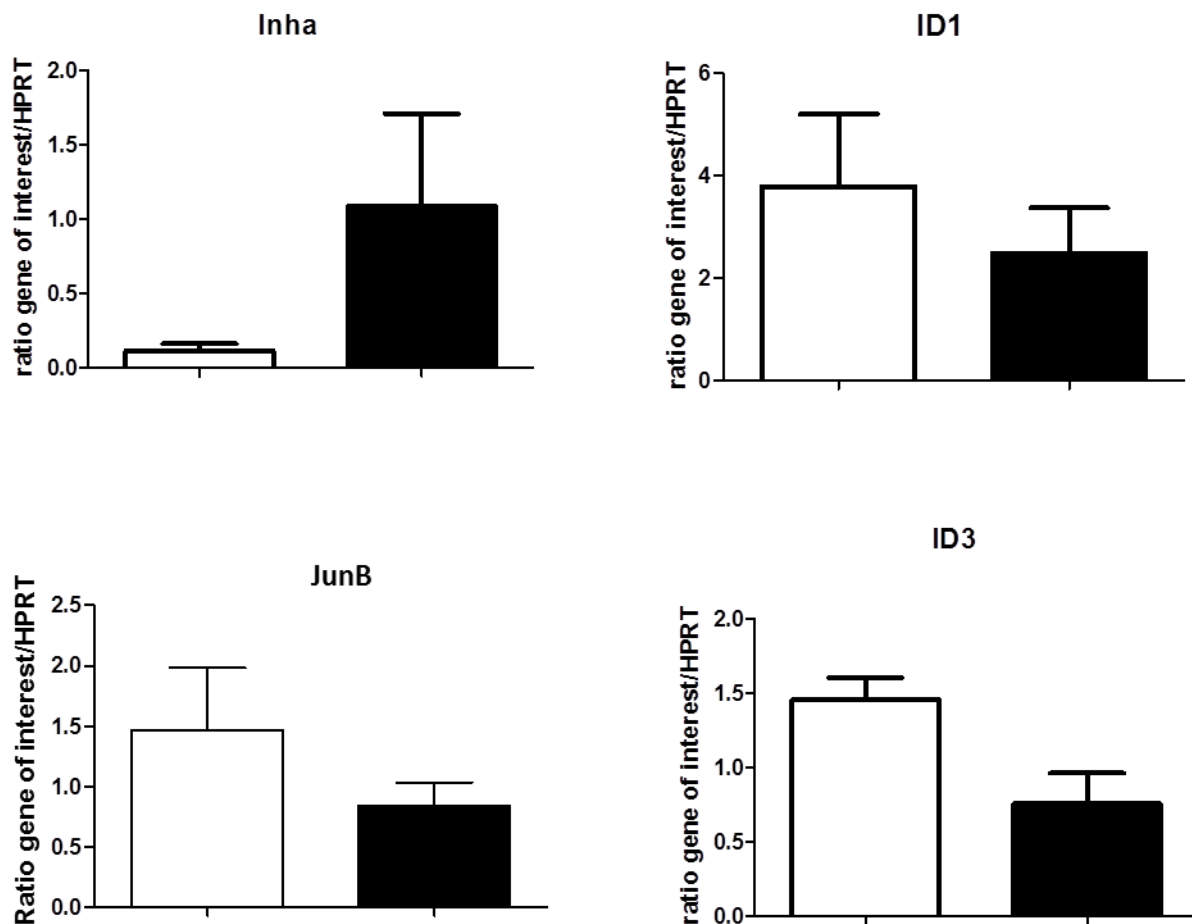


Figure 56: Validation des résultats par q-PCR. 4 nouveaux échantillons d'utéri WT et KO pour l'*Amh* ont été prélevés. L'expression des gènes *Inha*, *Id1*, *Junb* et *Id3* a été analysée par q-PCR. On observe une diminution de l'expression de *Junb*, *Id1* et *Id3* dans les utéri KO *Amh* et une augmentation pour *Inha* (n=4).

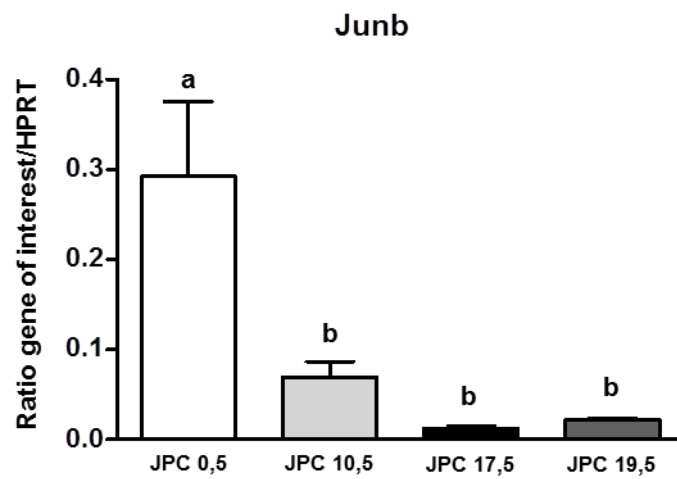


Figure 57: Expression de *Junb* dans l'utérus gravide. L'expression de *Junb* a été analysée par q-PCR sur des échantillons d'utéri à 0,5 jpc, 10,5 jpc, 17,5 jpc et 19,5 jpc. L'expression de *Junb* diminue au cours de la gestation (n=4).

Discussion générale et perspectives

I Problématique

Depuis sa découverte dans les années 50, l'AMH a été majoritairement étudiée chez le mâle. En effet, cette hormone doit son nom à sa fonction sur les canaux de Müller. Elle est responsable de leur régression chez le fœtus mâle (Jost 1953). La génération de souris invalidées pour l'*Amh* a confirmé les découvertes d'Alfred Jost. Les souris mâles KO *Amh* sont normalement virilisées et possèdent un utérus, résidu de la non dégradation des canaux de Müller (Behringer, Finegold et al. 1994). Par ailleurs, ces souris sont infertiles du fait de la présence d'un utérus empêchant la migration des spermatozoïdes. Chez l'homme, les mutations du gène de l'*AMH* ou de son récepteur spécifique *AMHR2* sont associées au syndrome de persistance des canaux de Müller (PMDS) (Josso, Belville et al. 2005). Ces hommes possèdent des organes génitaux externes normaux et présentent des résidus de dérivés Müllériens tels que l'utérus ou les trompes. A la différence des souris mâles, les souris femelles KO *Amh* ne présentent pas de phénotype évident et sont fertiles (Behringer, Finegold et al. 1994). De plus, les mutations des gènes de l'*Amh* ou d'*Amhr2* chez la femme n'engendrent aucune anomalie de reproduction visible (Josso, Belville et al. 2005). L'absence de phénotype majeur chez la femelle a pendant longtemps causé son désintérêt scientifique et médical. L'étude approfondie du phénotype ovarien des souris femelles KO *Amh* a cependant montré un rôle de cette hormone sur la folliculogenèse. Il a été montré que l'AMH inhibe le recrutement des follicules primordiaux et diminue la sensibilité à la FSH des follicules en croissance (Durlinger, Kramer et al. 1999 ; Durlinger, Grujters et al. 2001). L'AMH agirait donc globalement comme un régulateur négatif de la folliculogenèse. De plus, l'AMH jouerait un rôle dans l'équilibre entre croissance folliculaire et atresie (Visser, Durlinger et al. 2007). A l'heure actuelle, l'AMH est devenue, un marqueur très utilisé en clinique notamment pour évaluer la réserve ovarienne et la réponse à des stimulations dans le cadre de la procréation médicalement assistée (Fanchin, Taieb et al. 2005 ; Dewailly, Andersen et al. 2014). Elle est également un marqueur prédictif de l'âge de la survenue de la ménopause (Dolleman, Depmann et al. 2014). L'AMH étant corrélée au nombre de petits follicules en croissance, son expression est très élevée chez les femmes présentant un syndrome des ovaires polykystiques (Pigny, Merlen et al. 2003). Un dosage de l'AMH permet également de détecter la survenue

ou la récurrence de cancers de la granulosa (Rey, Sabourin et al. 2000).

Mon projet de thèse s'inscrit dans un environnement scientifique où la recherche sur l'AMH connaît un essor en clinique mais où ses rôles et son mécanisme d'action sont encore mal connus chez la femme. Mon projet de thèse s'articulait autour de 3 grands axes. Le premier visait à déterminer les acteurs de la voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa murine. Le second avait pour but de trouver de nouveaux gènes régulés par cette hormone pour mieux cerner ses rôles dans l'ovaire. Enfin, le dernier axe de mon projet était l'étude des potentiels effets de l'AMH dans l'utérus en commençant par analyser son expression au sein de cet organe. Dans ce chapitre du manuscrit, les résultats obtenus au cours de l'ensemble de mon étude seront discutés et confrontés aux données actuelles de la littérature. Cette discussion permettra de définir des perspectives de travail pour améliorer les connaissances sur l'AMH et ses rôles dans le tractus génital femelle.

II Voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa

L'AMH, en tant que membre de la famille du TGF- β , transduit ses effets par l'intermédiaire de deux récepteurs transmembranaires à serine/threonine kinase de type I et II. Après fixation du ligand sur le récepteur de type II (AMHR-II), celui-ci recrute et phosphoryle le récepteur de type I (ActR-IA, BMPR-IA ou BMPR-IB). Ce dernier phosphoryle à son tour les Smads spécifiques qui s'associent avec Smad4 et l'ensemble est transloqué dans le noyau. Ces complexes R-Smad/Smad4 vont alors s'associer avec des facteurs de transcription pour activer ou inhiber des gènes cibles potentiels. Je me suis intéressée aux acteurs nécessaires à la transduction du signal de l'AMH dans les cellules de la granulosa murine (CG). Les récepteurs ont été invalidés transitoirement *in vitro* (transfection de siRNA spécifiques) ou de façon permanente *in vivo* (souris mutantes conditionnelles) dans les CG. Ceci m'a permis de montrer que l'AMH utilisait le récepteur BMPR-IA (ALK3) dans les CG immatures en culture primaire (Sedes, Leclerc et al. 2013). La technique de gènes rapporteurs (Smad-Gal4/UAS-luciférase) m'a permis de mettre en évidence que l'AMH induisait le recrutement et la phosphorylation des Smad1 et 5 dans les CG. Enfin, j'ai cherché à déterminer si les co-récepteurs des BMPs, les Repulsive guidance molecule (RGMa, b et c), pouvaient également être des co-récepteurs de l'AMH. Seul RGMb est exprimé dans les CG et il ne semble pas nécessaire à la transduction du signal de cette hormone (Sedes, Leclerc et al. 2013).

1 Récepteur de type I

BMPR-IA est le récepteur de type I de l'AMH principalement impliqué dans la régression Müllérienne (Jamin, Arango et al. 2002). En effet, les souris mâles KO conditionnelles pour ce récepteur présentent une rétention des canaux de Müller. Ce récepteur de type I est également le récepteur utilisé pour la transduction du signal de l'AMH dans la lignée de cellules de Sertoli immatures SMAT-1 et dans les cellules de Leydig (Belville, Jamin et al. 2005 ; Wu, Zhang et al. 2012). Les résultats obtenus dans les cellules de la granulosa en culture primaire appuient les résultats précédents et tendent à montrer que BMPR-IA serait le récepteur de type I prioritairement recruté par l'AMH pour transduire son signal dans le tractus génital mâle et femelle. Cependant, dans le canal de Müller et dans la lignée de cellules de Sertoli, le récepteur ActR-IA est capable de compenser la perte de BMPR-IA. Dans les CG isolées à partir de souris cKO *Bmpr1a*, l'absence totale de phosphorylation des Smad1/5/8 après une exposition à de l'AMH indique qu'il n'y a pas de compensation par les autres récepteurs de type I. Il aurait tout de même été intéressant de mesurer l'expression des deux autres récepteurs de type I pour voir si une augmentation de leurs expressions est observable dans les CG cKO *Bmpr1a*. Les souris cKO *Bmpr1a* sont hypofertiles (Edson, Nalam et al. 2010). Elles ont moins de portées sur une vie reproductive que les souris contrôles et elles ont également moins de petits par portée. Après 4 mois, la moitié des souris cKO pour *Bmpr1a* sont stériles et à 6 mois elles le sont presque toutes. Ces souris présentent un défaut de la folliculogénèse. Leurs ovaires contiennent beaucoup plus de petits follicules en croissance que les souris contrôles (Edson, Nalam et al. 2010). Comme les souris KO *Amh*, les souris cKO *Bmpr1a* présentent une folliculogénèse accélérée et une fin de vie reproductive précoce. Ce phénotype est en accord avec nos résultats qui montrent que BMPR-IA est le récepteur utilisé par l'AMH dans les CG. Chez les souris cKO pour *Bmpr1a*, l'AMH ne peut plus transduire son signal. En revanche, les souris KO *Amh* ont un nombre de portées et de petits par portée plus important que les souris contrôles. Les souris cKO *Bmpr1a* présentent des défauts de fertilité plus importants que les souris KO *Amh*. Ceci semble logique car le récepteur BMPR-IA est également nécessaire à la transduction du signal des BMPs, eux-mêmes impliqués dans la folliculogénèse.

Déterminer les acteurs de la voie de signalisation de l'AMH pourrait permettre de mieux comprendre certaines pathologies de la reproduction. A l'heure actuelle, il n'a pas

encore été trouvé de lien entre l'insuffisance ovarienne précoce et l'AMH. Les études sont d'ailleurs controversées sur le fait que l'AMH puisse être un marqueur de cette pathologie (Visser, Schipper et al. 2012). En effet, il semblerait que dans de nombreux cas les taux d'AMH circulants soient normaux. De plus, la cause de ce syndrome ne semble pas provenir de mutations dans les gènes de l'AMH ou de son récepteur de type II, *AMHR2* (Yoon, Choi et al. 2013). On pourrait alors imaginer que ce soit un autre acteur de la voie de signalisation de l'AMH qui soit touché. En effet, une mutation ou une diminution de l'expression de *Bmpr1a* induirait une diminution de la transduction de l'AMH (et potentiellement des BMPs) et une augmentation du recrutement folliculaire. Il a récemment été montré que dans le SOPK les cellules de la granulosa humaines surexpriment *BMPRIA* (Khalaf, Morera et al. 2013). Ce syndrome s'accompagne d'une augmentation du taux d'AMH circulant due à l'accumulation des petits follicules en croissance. L'augmentation de l'expression de *BMPRIA* pourrait induire une augmentation de la transduction du signal de l'AMH, un blocage de la maturation folliculaire et une absence d'ovulation.

2 Les protéines Smad

L'AMH induit la phosphorylation des Smad1/5/8. Il existe une redondance entre les protéines Smads impliquées dans le processus de régression du canal de Müller bien que la Smad5 semble jouer un rôle plus important que les autres Smads (Orvis, Jamin et al. 2008). Dans la lignée de cellules de Sertoli SMAT-1, il a été montré que les protéines Smad 1/5/8 étaient phosphorylées suite à une exposition à l'AMH (Belville, Jamin et al. 2005). Dans le modèle des CG en culture primaire, l'AMH induit la phosphorylation des protéines Smad1 et 5. Je n'ai pu étudier cet effet que par le biais de la technique de gènes rapporteurs Smad-Gal4/UAS-luciférase. L'utilisation de siRNA pour tenter d'éteindre l'expression des gènes codant pour chacune des Smad n'a pas entraîné de diminution de plus de 50%. Cette approche n'a donc pas été retenue. Pour confirmer mes résultats, il serait intéressant d'étudier les CG isolées de souris invalidées pour chacune des *Smad* et de vérifier, suite à une exposition à l'AMH, l'expression de certains des gènes cibles de cette hormone.

3 Les co-récepteurs

Il existe de nombreux co-récepteurs pour les membres de la famille du TGF- β . Les RGMs semblaient être de bons candidats car ils interviennent uniquement pour la transduction du signal des BMPs. Or, l'AMH et les BMPs partagent leur voie de signalisation. Parmi les

trois RGM connus chez le rongeur, RGMa, b et c, seul RGMb est exprimé dans les CG. Les résultats de mon étude montrent que ce co-récepteur ne semble pas indispensable à la signalisation de l'AMH dans les CG. Les souris KO *Rgmb* meurent avant leur maturité ce qui empêche l'étude du rôle de ce co-récepteur sur la fonction reproductrice (Xia, Cortez-Retamozo et al. 2011). Il aurait été intéressant de générer des souris KO conditionnelles pour *Rgmb* en utilisant la lignée de souris *Amhr2-cre*, pour analyser les CG isolées de ces souris. Cependant, il n'existe actuellement pas de lignée « floxée » pour ce gène ce qui rend la génération de souris cKO longue et contraignante.

Il serait intéressant de tester d'autres co-récepteurs de la famille du TGF- β . En effet, tous les co-récepteurs des membres de la famille du TGF- β restent des candidats potentiels pour participer à la transduction du signal de l'AMH. L'analyse pourrait être faite in vitro par l'utilisation de siRNA pour éteindre transitoirement l'expression de chaque co-récepteur. L'étude directe des CG isolées à partir des souris KO pour les différents co-récepteurs est difficile car la plupart de ces souris meurent précocement. C'est le cas des souris KO *Tgfb3* (betaglycan) (Compton, Potash et al. 2007), *Tdgf* (Cripto) (Ding, Yang et al. 1998), *Eng* (endoglin) (Lopez-Novoa and Bernabeu 2010). Seules les souris KO pour *Cd109* sont viables et ne présentent qu'une hyperplasie des cellules de l'épiderme (Mii, Murakumo et al. 2012). La fonction reproductrice de ces souris n'a, en revanche, pas été étudiée. Il serait donc possible d'isoler les CG des souris KO *Cd109* pour évaluer son rôle dans la signalisation de l'AMH. Les lignées « floxées » pour les gènes *Tgfb3* (EUCOMM tools projects, centre Helmholtz, Munich), *Eng* (Allinson, Carvalho et al. 2007) et *Tdgf* (Chu, Ding et al. 2005) ont été générées. Nous possédons au laboratoire la lignée de souris *Amhr2-cre* qui permettrait d'invalider chacun de ces gènes spécifiquement dans les cellules de la granulosa. Les CG pourraient alors être isolées de ces souris KO conditionnelles et analysées.

4 Voies alternatives

En parallèle de la voie de signalisation canonique de l'AMH, j'ai mené des expériences visant à étudier les voies alternatives de cette hormone. Il a été montré que dans certains types cellulaires, l'AMH pouvait activer la voie de la β -caténine ou la voie NF- κ B (Kobayashi, Stewart et al. 2011 ; Segev, Hoshiya et al. 2001 ; Segev, Hoshiya et al. 2002). Les résultats préliminaires obtenus montrent que l'AMH ne semble pas avoir d'effet sur la voie NF- κ B dans les CG alors qu'elle inhiberait légèrement la voie de la β -caténine. En effet, une

exposition à l'AMH entraîne une augmentation de la phosphorylation de la β -caténine qui est la forme inactive de cette protéine. Une étude récente a montré que les souris femelles dont le gène *Wnt4* a été invalidé dans les cellules de la granulosa présentent de nombreux défauts ovariens. En effet, l'ovaire de ces souris présente une mauvaise mise en place de la membrane basale, une apoptose plus importante des cellules de la granulosa, une mauvaise polarité de ces cellules, un nombre réduit de cellules de la thèque ou encore une forte diminution de l'expression de l'*Amh* (Prunskaitė-Hyyryläinen, Shan et al. 2014). Cette forte diminution de l'expression de l'*Amh* entraîne un recrutement accru des follicules primordiaux et un épuisement précoce de la réserve folliculaire. L'AMH, WNT4 et la β -caténine cytoplasmique sont nécessaires à une fonction ovarienne normale et semblent être liées dans la régulation de cette fonction. Il a également été montré que la β -caténine induisait une augmentation de l'expression de l'aromatase par fixation directe sur le promoteur (Parakh, Hernandez et al. 2006 ; Hernandez Gifford, Hunzicker-Dunn et al. 2009). L'AMH ayant une action opposée sur l'expression de l'aromatase (di Clemente, Goxe et al. 1994), on peut suggérer que l'inhibition de la voie β -caténine participe à l'inhibition de l'expression de cette enzyme. La poursuite d'expériences in vitro serait intéressante pour comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de ces deux gènes. Il semble que dans les CG la β -caténine régule l'expression de l'*Amh*. En revanche, l'action de l'AMH sur l'expression de la β -caténine reste à définir. La recherche de sites de liaison des protéines Smads sur les régions régulatrices du gène codant pour la β -caténine serait une bonne piste de départ. Les modèles de souris KO *Amh* ou *Wnt4* semblent être de bons modèles d'étude de pathologies ovariennes telle que l'insuffisance ovarienne précoce. L'étude approfondie de la collaboration entre l'AMH et la voie de la β -caténine sont importantes pour l'amélioration des connaissances dans le domaine de la physiopathologie ovarienne.

III Gènes cibles de l'AMH dans les CG

A l'heure actuelle seuls peu de gènes régulés par l'AMH ont été décrits dans les cellules de l'ovaire ne permettant qu'une compréhension partielle du rôle de cette hormone. Ayant identifié les acteurs de la voie de signalisation de l'AMH dans des CG isolées à partir de souris immatures de 3 semaines, nous avons choisi d'étudier les gènes cibles de l'AMH à ce stade pour maintenir une continuité dans mon projet de thèse. Nous avons opté pour une approche globale basée sur les puces MoGene® 2.0 ST (Affymetrix) et choisi de mener deux

études en parallèle : l'une visant à comparer les transcriptomes d'ovaires contrôles et d'ovaires KO pour l'*Amh* et l'autre ceux de cellules de la granulosa exposées ou non à de l'AMH recombinante pendant 6h et 24h. L'objectif de ces projets était de discriminer des gènes différentiellement exprimés suite à une exposition à l'AMH et dans un contexte où l'AMH est absente depuis la naissance de l'animal comme c'est le cas chez les souris KO. Dans notre étude, peu de transcrits correspondant à des gènes connus se sont révélés différentiellement régulés dans l'une ou l'autre des expériences.

1 Résultats et perspectives

La comparaison des transcriptomes des ovaires WT et KO *Amh* a permis de trouver de nouveaux gènes régulés par l'AMH dans cet organe. Il s'agit des gènes *Kcnj2*, *Tdg* et *Ovgp1*. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si la régulation par les Smad phosphorylées est directe ou non. La comparaison des transcriptomes de CG exposées ou non à de l'AMH pendant 6 h ou 24 h a permis de montrer que les gènes *Cyp11a1* et *Cyp17a1* sont régulés négativement par l'AMH. Je n'ai pas eu l'occasion d'approfondir l'étude de ces deux gènes qui semblent cependant intéressants : *Cyp17a1* permettant d'appuyer les résultats connus sur l'action de l'AMH sur la stéroïdogenèse et *Cyp11a1* permettant de définir un potentiel nouveau rôle de l'AMH sur la métabolisation des oestrogènes et des xénobiotiques. Les perspectives de travail pour l'ensemble de ces potentiels gènes cibles de l'AMH dans l'ovaire et les CG ont été détaillées dans la partie résultats de ce manuscrit (pages 195-197).

L'analyse des puces a révélé de nombreux transcrits dérégulés par l'AMH mais n'ayant pas d'annotations connues. Certains de ces transcrits présentent des variations d'expressions très importantes entre nos différentes conditions et s'avèrent donc être de très bon candidats. Cependant l'absence de connaissances sur une potentielle protéine et donc l'absence d'anticorps disponibles rendaient les analyses difficiles.

2 Critique du choix de l'échantillonnage

Dans le but de maintenir une continuité dans mon projet nous avons choisi d'étudier les gènes potentiellement régulés par l'AMH chez la souris immature de 3 semaines que ce soit pour l'ovaire entier ou pour les CG isolées. Nos résultats ne montrent que peu de gènes dérégulés en absence d'AMH (ovaire KO) ou après exposition à l'hormone (CG +/- AMH). A ce stade, les souris ne sont pas cyclées et la folliculogenèse n'est pas complète. Il a été montré que chez l'animal mature l'AMH inhibe l'entrée en croissance des follicules primordiaux et

diminue la sensibilité à la FSH des follicules en croissance (Durlinger, Gruijters et al. 2001) (Durlinger, Gruijters et al. 2002). Il est possible qu'à 3 semaines, bien qu'elle soit exprimée, l'AMH n'ait pas encore d'effet sur la folliculogenèse. Ceci expliquerait qu'aucun gène connu pour réguler cette fonction ne soit modifié, que ce soit dans l'ovaire KO *Amh* ou dans les CG exposées à l'hormone.

2.1 Ovaire WT vs Ovaire KO *Amh*

Chez la souris KO *Amh*, l'hormone n'a jamais été produite et l'ovaire n'y a donc jamais été exposé. Une augmentation du nombre de petits follicules en croissance est observable à partir de 25 jours (Durlinger, Kramer et al. 1999). Cette augmentation est également retrouvée chez les femelles hétérozygotes pour l'*Amh* à ce stade. A 4 mois, on observe trois fois plus de petits follicules en croissance dans l'ovaire KO *Amh* que dans l'ovaire contrôle. De plus, cette augmentation est significativement plus importante que dans l'ovaire hétérozygote. A 3 semaines, soit 21 jours post-partum, les défauts dûs au manque de cette hormone ne sont pas ou peu visibles au niveau histologique. Cependant, au niveau transcriptomique, nous attendions plus d'expression différentielle à ce stade. Il aurait été intéressant de comparer également les transcriptomes d'ovaires contrôles et KO pour l'*Amh* à un stade où la folliculogenèse a déjà été touchée par le manque d'hormone, par exemple à 4 mois au stade où la folliculogenèse de la souris KO *Amh* est perturbée de façon très prononcée. Ce choix aurait engendré d'autres contraintes, notamment en raison des variations possibles au cours du cycle.

2.2 CG exposées à l'AMH : critique de la dose

L'ensemble de mon travail sur la voie de signalisation de l'AMH dans les CG a été réalisé en exposant ces cellules à une dose de 1 µg/ml (8 nM) d'AMH. Bien que cette dose soit appropriée pour observer une réponse de l'AMH en termes de phosphorylation des Smad, nous avons choisi d'augmenter la dose pour le micro-array. En effet, j'ai pu observer en Western blot que la phosphorylation des protéines Smads augmente en réponse à une dose plus forte d'AMH, à savoir dans notre cas 5 µg/ml (40 nM) (données non montrées). Pour accentuer l'effet de l'AMH sur la transcription de ses gènes cibles, nous avons décidé d'utiliser la dose de 5 µg/ml. Nos résultats montrent que l'augmentation de la dose d'AMH n'était pas complètement justifiée. En effet, seuls peu de transcrits présentent une

dérégulation de leur expression. De plus, *Id3* que nous avons identifié comme gène régulé par l'AMH dans les CG ne présente pas d'augmentation significative de son expression. Il semblerait donc qu'une trop forte concentration d'AMH n'est pas été la stratégie expérimentale la plus appropriée. Des analyses ont été menées chez le rat pour déterminer un effet de l'AMH sur le recrutement des follicules primordiaux. Des ovaires de rat ont été prélevés à 4 jours post nataux et exposés pendant 10 jours à de l'AMH à 50 ng/ml (Nilsson, Rogers et al. 2007). Bien que le temps d'exposition à l'AMH soit plus important que le nôtre, une dose 100 fois plus faible que celle que nous avons utilisée a permis de sélectionner plus de 700 transcrits dont l'expression variaient significativement suite au traitement. Il est possible qu'une exposition à une trop forte dose d'AMH ait entraîné une désensibilisation du signal. Dans le cas des récepteurs sérine/thréonine kinase, la désensibilisation du signal peut être due à différents mécanismes. On peut, par exemple, observer dans les CG une augmentation de la transcription des gènes codant pour les protéines I-Smad, Smad 6 et 7. Les CG exposées à 5 µg/ml d'AMH présentent une légère augmentation de l'expression de ces protéines mais cette augmentation n'est pas significative (données non montrées). Les I-Smads pourraient cependant interagir avec le récepteur de type I et prévenir le recrutement et la phosphorylation des R-Smads. Une autre possibilité pour diminuer le signal de l'AMH est le recrutement d'ubiquitine ligases et de phosphatases permettant la désactivation et la dégradation des récepteurs et des R-Smads.

2.3 Transcriptome des cellules de la granulosa

Les échantillons d'ovaires et de CG ont été prélevés chez la souris immature de 3 semaines. Ceci permet la comparaison du transcriptome des ovaires WT et des CG non exposées à l'AMH. Cette analyse permet d'établir les gènes spécifiquement exprimés par les CG immatures. Les figures correspondant à cette étude sont présentées en annexe. 16639 transcrits sont exprimés au-dessus du bruit de fond (BEC~5,89). Parmi eux, 2632 présentent une expression différentielle significative entre l'ovaire entier et les CG isolées avec un facteur de régulation au moins égal à 2. 980 transcrits sont régulés positivement dans les CG et 1653 sont régulés négativement (figure 59 en annexe). La comparaison du transcriptome des CG avec celui de l'ovaire entier permet de définir certains enrichissements fonctionnels (figure 60 en annexe). On observe que de nombreux gènes exprimés dans les CG régulent la fonction reproductrice, le développement gonadique, la formation des gamètes ou encore

permettent de répondre à une stimulation aux oestrogènes (figure 60 en annexe). A l'inverse, les gènes participant à la méiose ou à l'ovogenèse sont régulés négativement dans les CG. La *heatmap* offre une représentation colorimétrique de l'intensité d'expression des transcrits différentiellement régulés entre l'ovaire entier et les CG isolées (figure 61 en annexe).

Parmi les transcrits significativement moins exprimés dans les CG que dans l'ovaire entier, on observe la présence des gènes *Cyp19a1* codant pour l'aromatase, *Fshr* et *Amh*. Le gène codant pour le récepteur de la FSH et celui codant pour l'AMH restent exprimés dans les CG mais de façon moindre que dans l'ovaire entier. En revanche, l'aromatase n'est plus (ou très peu) exprimée dans les CG en culture primaire. Ces 3 gènes codent pour des protéines marqueurs des cellules de la granulosa ovariennes. Il est donc surprenant d'observer une diminution de l'expression de ces gènes suite à un enrichissement des CG. Ce résultat suggère que la mise en culture primaire des cellules de la granulosa induit une diminution de l'expression de certains facteurs. Cette observation avait déjà été faite en ce qui concerne l'AMH dans les cellules de Sertoli. En effet, la mise en culture des cellules de Sertoli induit une rapide diminution de l'expression de l'*Amh* (Vigier, Picard et al. 1985). Ces deux types cellulaires étant très proches, il est fort probable que l'expression de l'*Amh* diminue également suite à la mise en culture des CG. Les résultats de la comparaison du transcriptome de l'ovaire versus celui des CG isolées confortent cette hypothèse. Il a déjà été montré que l'aromatase est faiblement exprimée dans les cellules de la granulosa immature en culture (di Clemente, Goxe et al. 1994). Son expression est détectable suite à une stimulation avec de l'AMPc. Il semble que l'expression de cette enzyme nécessite la présence d'autres facteurs exprimés par d'autres types cellulaires de l'ovaire. Bien que le gène codant pour le récepteur de la FSH reste exprimé dans les CG, son expression diminue. On peut supposer que, tout comme le gène codant pour l'aromatase, la régulation du gène *Fshr* nécessite l'intégrité de l'ovaire.

Il est intéressant de noter que le gène *Lhcgr* qui code pour le récepteur de la LH est exprimé dans l'ovaire entier mais plus dans les CG. Nous avons utilisé ce marqueur des cellules de la thèque pour évaluer la pureté de la culture de CG. Nous n'avons pas observé d'expression de ce gène dans les CG permettant de conclure qu'il n'y avait pas (ou peu) de contamination de la culture par des cellules de la thèque (Sedes, Leclerc et al. 2013). La comparaison du transcriptome de l'ovaire entier avec celui des CG isolées confirme nos précédents résultats.

IV AMH et physiologie utérine

1 Chez l'Homme

A l'heure actuelle, une seule étude s'est intéressée à l'expression de l'AMH dans l'utérus humain (Wang, Dicken et al. 2009). Cette étude montre que l'AMH est exprimée dans l'endomètre et que cette expression est augmentée par les oestrogènes et la progestérone. Cependant, aucun rôle de cette hormone n'a encore été réellement établi. AMHR-II, le récepteur spécifique de l'AMH est également exprimé dans l'endomètre humain (Wang, Dicken et al. 2009) ce qui suggère une action de l'AMH sur cette couche de l'utérus.

Pour tenter de définir un rôle de l'AMH dans l'utérus humain, des études se sont intéressées aux propriétés antiprolifératives de cette hormone. Il a été montré que le récepteur de l'AMH était exprimé dans des lignées de cellules endométriales normales et cancéreuses mais aussi dans une culture primaire de cellules stromales de l'endomètre (Renaud, MacLaughlin et al. 2005 ; Namkung, Song et al. 2012). Suite à une exposition à l'AMH, ces cellules présentent une diminution de croissance et une augmentation de leur apoptose conduisant les chercheurs à émettre l'hypothèse d'un potentiel traitement de certains cancers endométriaux par l'AMH. Bien que l'AMH soit exprimée dans l'utérus humain, il serait intéressant de déterminer si elle est biologiquement active dans cet organe. Dans le cas contraire, l'AMH ovarienne pourrait être responsable de la régulation de la fonction utérine.

2 Chez la souris

Aucune étude n'a été menée jusque-là sur l'expression de l'AMH, chez la souris. Cependant, à la différence de l'espèce humaine, AMHR-II est exprimé dans le myomètre utérin (Arango, Kobayashi et al. 2008). Il semble donc peu probable que l'AMH ait un effet direct sur les cellules endométriales chez la souris. La présence du récepteur dans le myomètre pourrait indiquer un rôle de l'AMH sur la survenue des contractions myométriales ou à l'inverse le maintien au repos du myomètre.

Le gène de l'*Amh* est exprimé dans l'utérus murin mais l'expression de la protéine reste à définir. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer plus nettement la présence ou non de l'AMH dans l'utérus. Le western blot visant à détecter l'AMH dans l'utérus entier n'a été réalisé qu'une seule fois et les résultats d'immunofluorescence sont variables. Si la protéine est exprimée dans une couche précise de l'utérus, voire dans un type

cellulaire précis, il est possible que le signal ne soit pas observable en analysant des échantillons d'utérus entier en Western blot. Nous tentons actuellement de mettre au point différentes techniques pour isoler les cellules myométriales et endométriales. Nous pourrions alors analyser les différents compartiments utérins séparément en Western blot et en immunocytochimie.

De nombreux gènes sont dérégulés dans l'utérus KO *Amh*. Ceci indique que l'AMH jouerait un rôle sur la régulation de la fonction utérine qu'elle soit exprimée ou non dans cet organe. On peut supposer que l'AMH produite au niveau de l'ovaire peut être transportée par voie sanguine jusqu'à l'utérus où elle peut réguler l'expression de certains gènes. Parmi les gènes dérégulés dans l'ovaire KO *Amh*, le gène *Junb* est 3 fois moins exprimé. Chez le rat, ce gène intervient dans la survenue du travail (Mitchell and Lye 2002). Les souris KO pour le gène *Junb* meurent prématurément entre 8,5 et 10 jpc à cause d'un mauvais développement du placenta (Schorpp-Kistner, Wang et al. 1999). Les embryons sont inaptes à l'établissement d'interactions avec le système circulatoire maternel. La mort prématurée de ces embryons empêche l'étude de leur fonction reproductrice. La lignée « floxée » existe (Kenner, Hoebertz et al. 2004). Il serait intéressant de générer une lignée KO conditionnelle pour ce facteur où il serait spécifiquement invalidé dans le myomètre utérin en croisant la lignée *Junb* « floxée » avec la lignée *Amhr2-Cre*. On pourrait alors comparer les phénotypes des utéri KO *Amh* et KO conditionnels *Junb*.

L'analyse du transcriptome complet des cellules myométriales isolées et exposées à de l'AMH serait intéressant pour découvrir les gènes régulés par cette hormone. On pourrait alors déterminer si l'AMH joue plutôt un rôle dans la survenue des contractions ou plutôt sur la régulation de la fonction utérine au repos.

Conclusion

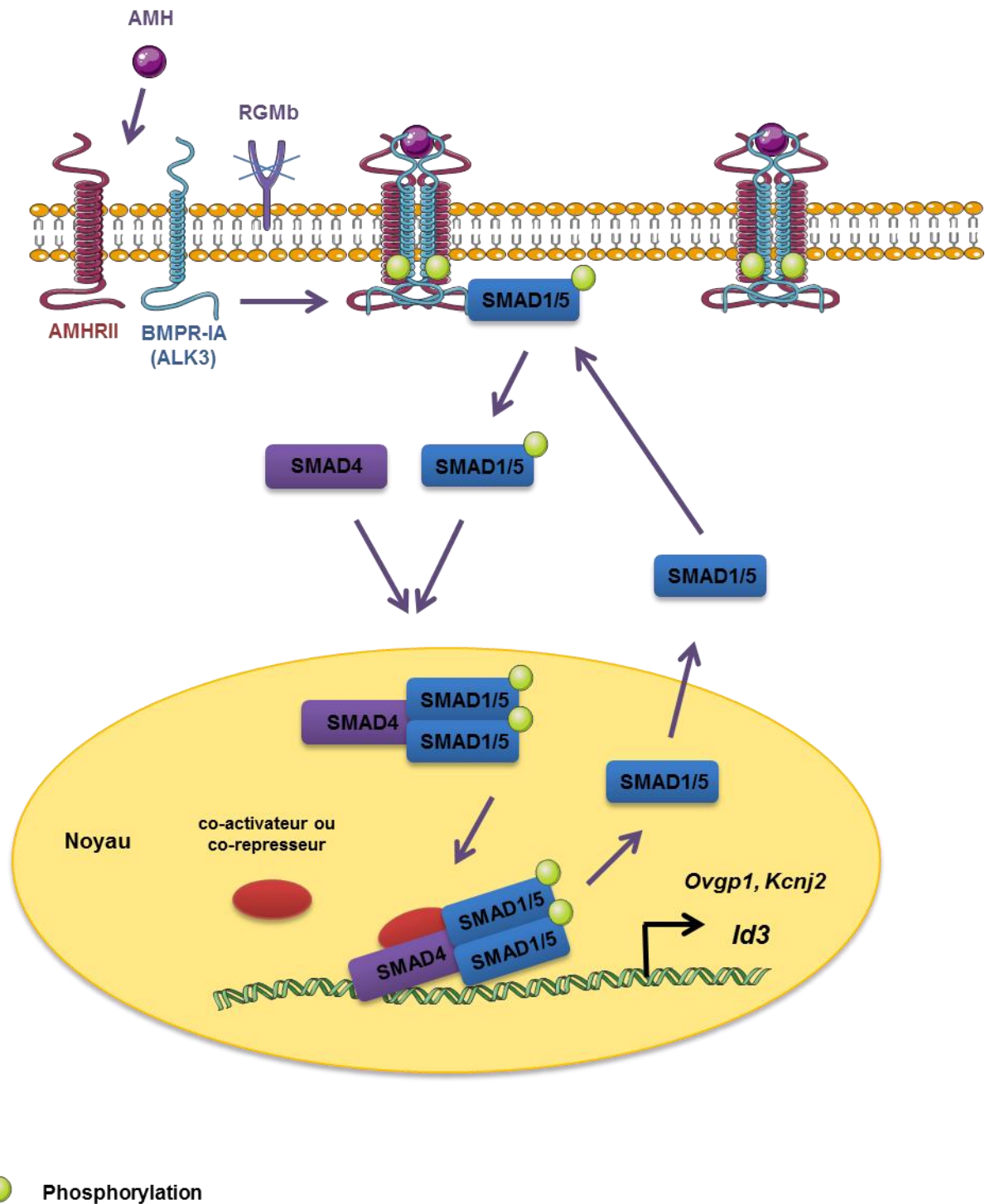


Figure 58: Voie de signalisation canonique de l'AMH dans les cellules de la granulosa immatures. L'AMH se fixe sur AMHR-II ce qui va induire la formation d'un complexe avec le récepteur de type I, BMPR-IA. L'AMH ne nécessite pas la présence du co-récepteur RGMb mais il n'est pas exclu que d'autres co-récepteurs interviennent dans la transduction du signal de l'AMH. AMHR-II va phosphoryler BMPR-IA. Les protéines Smad 1 et 5 vont ensuite être recrutées et phosphorylées au niveau du récepteur de type I. Une fois phosphorylées, les R-Smad se lient à la co-Smad et pénètrent dans le noyau. En association avec d'autres facteurs de transcriptions le complexe de protéines Smad va réguler les gènes cibles de l'AMH tels que *Id3* et potentiellement *Ovpg1* et *Kcnj2*.

Le rôle physiologique de l'AMH chez la femelle n'a pas encore été entièrement établi. Mon projet de thèse avait pour objectif d'élucider le(s) rôle(s) de cette hormone dans le tractus reproductif femelle. Au cours de mes trois années de thèse, j'ai principalement étudié les différents acteurs de la cascade de signalisation de l'AMH ainsi que les gènes cibles de cette hormone dans les cellules de la granulosa.

L'AMH transduit ses effets par l'intermédiaire de deux récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase : un récepteur de type II qui lui est spécifique (AMHRII) et un récepteur de type I. Après fixation de l'hormone sur le récepteur de type II, celui-ci recrute et phosphoryle le récepteur de type I. Ce dernier phosphoryle à son tour les Smads spécifiques (Smad 1, 5 et 8) qui s'associent à la Smad commune, Smad4. L'ensemble transloque dans le noyau et en association avec des facteurs de transcription régule des gènes cibles de l'hormone. J'ai pu montrer au cours de ma thèse que, dans les cellules de la granulosa immatures, l'AMH transduisait son signal via le récepteur de type I BMPR-IA induisant le recrutement et la phosphorylation des Smads 1 et 5 (figure 58). Récemment des co-récepteurs aux BMPs, les Repulsive guidance molecule (RGMs), ont été mis en évidence. L'AMH partageant sa voie de signalisation avec les BMPs, j'ai cherché à déterminer si ces co-récepteurs pouvaient également intervenir dans la voie de signalisation de l'AMH. Parmi les trois co-récepteurs RGMa, RGMb et RGMc, seul RGMb est exprimé dans les cellules de la granulosa. Mes résultats montrent que ce co-récepteur n'est pas nécessaire à la transduction du signal de l'AMH.

Actuellement, seuls deux gènes cibles de l'AMH sont connus dans les cellules de la granulosa : l'aromatase et le récepteur LH. J'ai mis en place et réalisé une analyse sur puces à ADN (micro-array) pour décrire de nouveaux gènes cibles de l'AMH. *Ovgp1* et *Kcnj2* sont dérégulés dans l'ovaire KO AMH et semblent être de bonnes cibles pour déterminer de nouveaux rôles de cette hormone dans l'ovaire.

La dernière partie de mon projet visait à déterminer un rôle potentiel de l'AMH dans l'utérus. Le récepteur de l'AMH est exprimé dans le myomètre utérin. L'expression du gène de l'*Amh* est faiblement détectable et la protéine ne semble pas présente dans l'utérus. Cependant, de nombreux gènes sont différentiellement exprimés entre l'utérus WT et l'utérus KO *Amh*. Ceci suggère que l'AMH ovarienne agirait sur l'utérus. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour pouvoir définir l'action de l'AMH sur cet organe.

Annexes

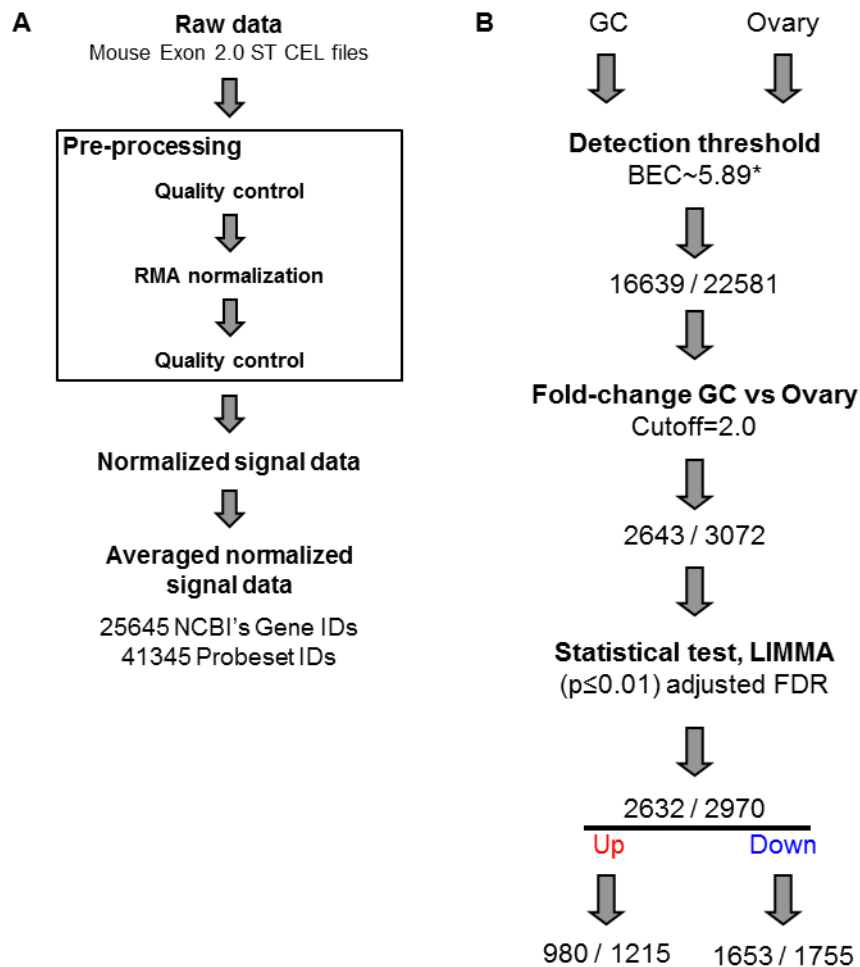


Figure 59: Stratégie de filtration des données. A : Normalisation des données brutes B : Sélection des transcrits par comparaison des données de l'ovaire WT et des CG isolées. Le nombre de transcrits et de probeset est donné à chaque étape de filtration. Les 2632 transcrits (correspondant à 2970 probeset) sont classés en deux groupes. Les transcrits régulés positivement (up) et les transcrits régulés négativement (down) dans les CG.

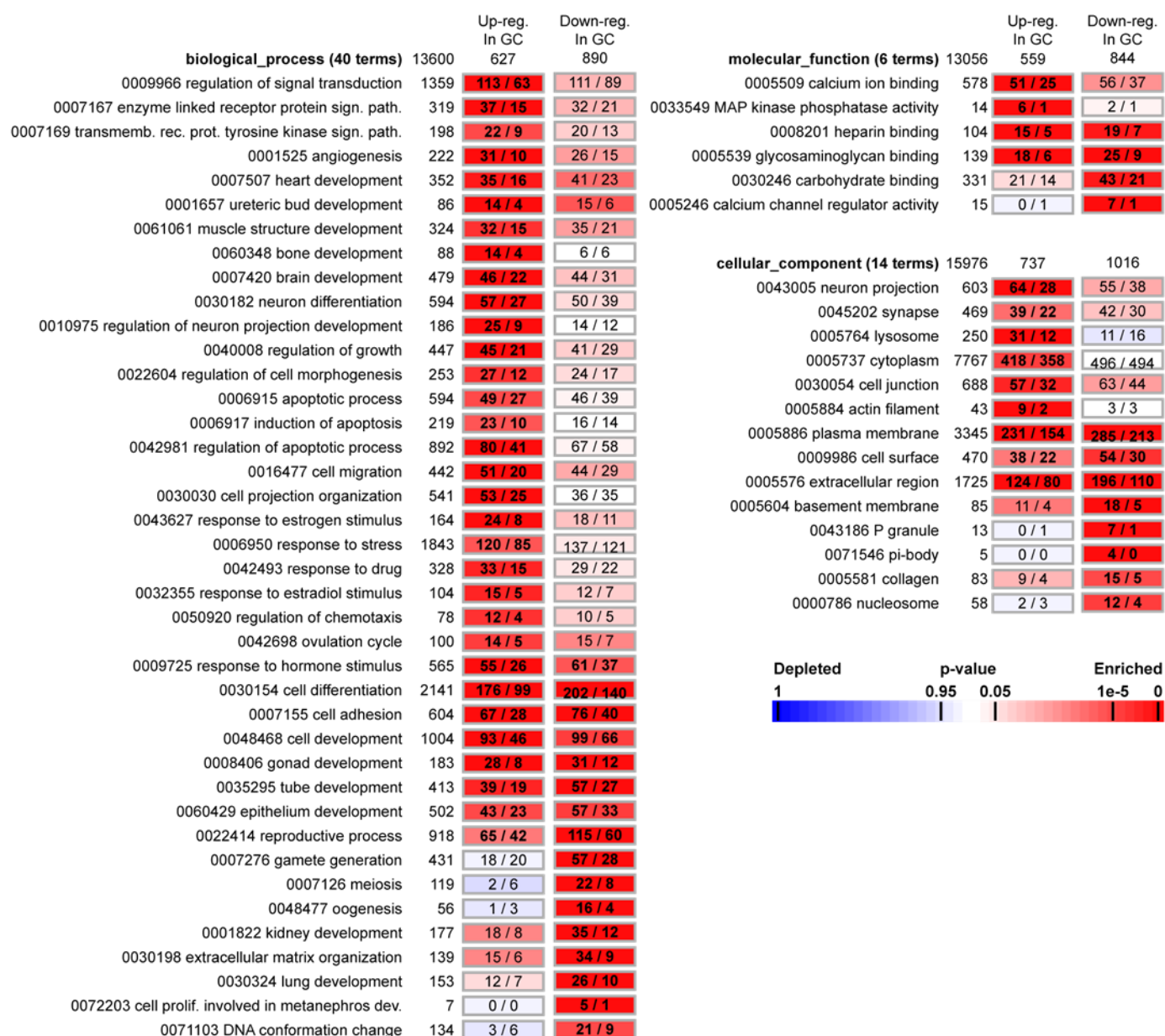


Figure 60 : Enrichissements fonctionnels dans les CG. Cette figure représente les enrichissements fonctionnels observés dans les cellules de la granulosa isolées. Dans les encadrés, le chiffre de gauche correspond au nombre de transcrits différentiellement exprimé observés dans les CG d'une fonction particulière. Le chiffre de droite correspond au chiffre attendu si la sélection était le fruit du hasard. Certaines fonctions sont enrichies dans les CG comme la réponse aux oestrogènes par exemple.

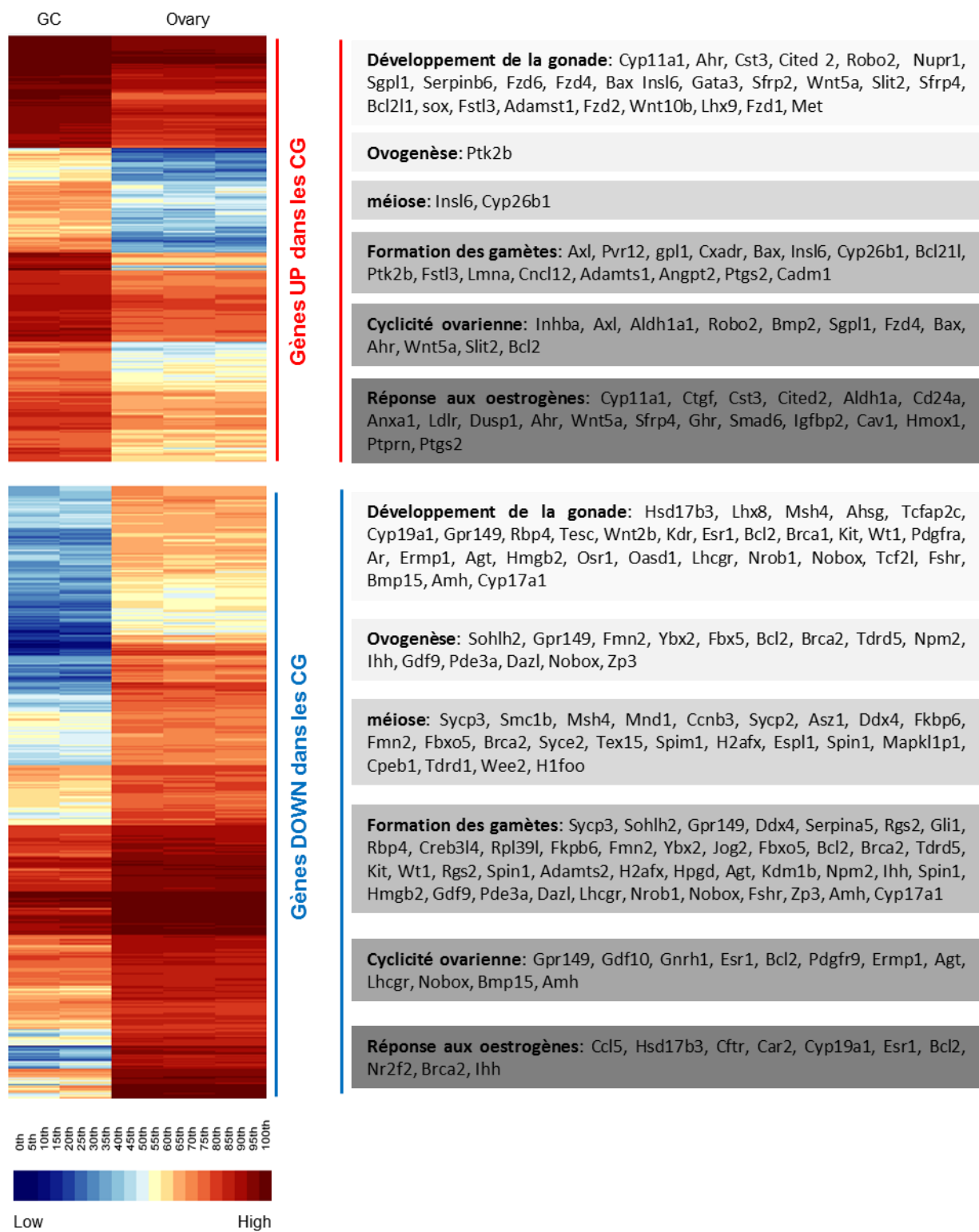


Figure 61 : Expression différentielle des transcrits entre l'ovaire WT et les CG isolées. La carte des chaleurs (heatmap) représente l'intensité d'expression de chaque transcrit selon l'échelle de couleur présentée sous cette carte. Le bleu représente les transcrits peu ou pas exprimés et le rouge correspond à une forte expression transcriptionnelle. Les gènes impliqués dans certaines fonctions enrichies dans les CG sont présentés dans les encadrés gris.

Références Bibliographiques

- Abel, M. H., A. N. Wootton, et al. (2000). "The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction." Endocrinology **141**(5): 1795-803.
- Ackert, C. L., J. E. Gittens, et al. (2001). "Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse." Dev Biol **233**(2): 258-70.
- AgoulNIK, A. I., B. Lu, et al. (2002). "A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd." Hum Mol Genet **11**(24): 3047-53.
- Al-Asaad, I., D. Chardard, et al. (2013). "Mullerian inhibiting substance in the caudate amphibian *Pleurodeles waltl*." Endocrinology **154**(10): 3931-6.
- Al-Attar, L., K. Noel, et al. (1997). "Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Mullerian hormone production in the postnatal mouse." J Clin Invest **100**(6): 1335-43.
- Albrecht, K. H. and E. M. Eicher (2001). "Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor." Dev Biol **240**(1): 92-107.
- Allard, S., P. Adin, et al. (2000). "Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin." Development **127**(15): 3349-60.
- Allinson, K. R., R. L. Carvalho, et al. (2007). "Generation of a floxed allele of the mouse Endoglin gene." Genesis **45**(6): 391-5.
- Anttonen, M., I. Ketola, et al. (2003). "FOG-2 and GATA-4 Are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression." Biol Reprod **68**(4): 1333-40.
- Ara, T., Y. Nakamura, et al. (2003). "Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5319-23.
- Araki, Y., M. Nohara, et al. (2003). "Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization." Biochem J **374**(Pt 2): 551-7.
- Arango, N. A., A. Kobayashi, et al. (2008). "A mesenchymal perspective of mullerian duct differentiation and regression in *Amhr2-lacZ* mice." Mol Reprod Dev **75**(7): 1154-62.
- Arango, N. A., R. Lovell-Badge, et al. (1999). "Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development." Cell **99**(4): 409-19.
- Arnhold, I. J., A. Lofrano-Porto, et al. (2009). "Inactivating mutations of luteinizing hormone beta-subunit or luteinizing hormone receptor cause oligo-amenorrhea and infertility in women." Horm Res **71**(2): 75-82.
- Arnold, S. J., S. Maretto, et al. (2006). "Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo." Dev Biol **296**(1): 104-18.
- Atchison, F. W., B. Capel, et al. (2003). "Pin1 regulates the timing of mammalian primordial

- germ cell proliferation." Development **130**(15): 3579-86.
- Baarends, W. M., J. W. Hoogerbrugge, et al. (1995). "Anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat." Endocrinology **136**(12): 5614-22.
- Baarends, W. M., M. J. van Helmond, et al. (1994). "A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct." Development **120**(1): 189-97.
- Babitt, J. L., Y. Zhang, et al. (2005). "Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor." J Biol Chem **280**(33): 29820-7.
- Baker, J., M. P. Hardy, et al. (1996). "Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction." Mol Endocrinol **10**(7): 903-18.
- Bakkebo, M., K. Huse, et al. (2012). "SARA is dispensable for functional TGF-beta signaling." FEBS Lett **586**(19): 3367-72.
- Barbara, N. P., J. L. Wrana, et al. (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily." J Biol Chem **274**(2): 584-94.
- Barlow, C., M. Liyanage, et al. (1998). "Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I." Development **125**(20): 4007-17.
- Barrionuevo, F. J., M. Burgos, et al. (2012). "Genes promoting and disturbing testis development." Histol Histopathol **27**(11): 1361-83.
- Beau, C., N. Vivian, et al. (2001). "In vivo analysis of the regulation of the anti-Mullerian hormone, as a marker of Sertoli cell differentiation during testicular development, reveals a multi-step process." Mol Reprod Dev **59**(3): 256-64.
- Beck, A. R., I. J. Miller, et al. (1998). "RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2331-6.
- Behringer, R. R. (1994). "The in vivo roles of mullerian-inhibiting substance." Curr Top Dev Biol **29**: 171-87.
- Behringer, R. R., R. L. Cate, et al. (1990). "Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance." Nature **345**(6271): 167-70.
- Behringer, R. R., M. J. Finegold, et al. (1994). "Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development." Cell **79**(3): 415-25.
- Belville, C., S. P. Jamin, et al. (2005). "Role of type I receptors for anti-Mullerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line." Oncogene **24**(31): 4984-92.
- Benedict, J. C., T. M. Lin, et al. (2000). "Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development." Toxicol Sci **56**(2): 382-8.
- Bengtsson, H., I. Epifantseva, et al. (2008). "Generation and characterization of a Gdf1 conditional null allele." Genesis **46**(7): 368-72.
- Beppu, H., M. Kawabata, et al. (2000). "BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos." Dev Biol **221**(1): 249-58.

- Bernard, P., J. Ryan, et al. (2012). "Wnt signaling in ovarian development inhibits Sf1 activation of Sox9 via the Tesco enhancer." Endocrinology **153**(2): 901-12.
- Berta, P., J. R. Hawkins, et al. (1990). "Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor." Nature **348**(6300): 448-50.
- Bilandzic, M., S. Chu, et al. (2009). "Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells." Mol Endocrinol **23**(4): 539-48.
- Birk, O. S., D. E. Casiano, et al. (2000). "The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation." Nature **403**(6772): 909-13.
- Bizet, A. A., K. Liu, et al. (2011). "The TGF-beta co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF-beta receptors." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 742-53.
- Blanchard, M. G. and N. Josso (1974). "Source of the anti-Mullerian hormone synthesized by the fetal testis: Mullerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture." Pediatr Res **8**(12): 968-71.
- Boatman, D. E. and G. E. Magnoni (1995). "Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster." Biol Reprod **52**(1): 199-207.
- Boerboom, D., M. Paquet, et al. (2005). "Misregulated Wnt/beta-catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development." Cancer Res **65**(20): 9206-15.
- Boyer, A., E. Lapointe, et al. (2010). "WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility." FASEB J **24**(8): 3010-25.
- Broekmans, F. J., J. A. Visser, et al. (2008). "Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction." Trends Endocrinol Metab **19**(9): 340-7.
- Bruce, D. L. and G. P. Sapkota (2012). "Phosphatases in SMAD regulation." FEBS Lett **586**(14): 1897-905.
- Buhi, W. C. (2002). "Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein." Reproduction **123**(3): 355-62.
- Bustin, S. A. and R. Mueller (2005). "Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis." Clin Sci (Lond) **109**(4): 365-79.
- Campbell, K. L. (1979). "Ovarian granulosa cells isolated with EGTA and hypertonic sucrose: cellular integrity and function." Biol Reprod **21**(4): 773-86.
- Carabatsos, M. J., C. Sellitto, et al. (2000). "Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence." Dev Biol **226**(2): 167-79.
- Carroll, T. J., J. S. Park, et al. (2005). "Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system." Dev Cell **9**(2): 283-92.
- Castonguay, R., E. D. Werner, et al. (2011). "Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth." J Biol Chem **286**(34): 30034-46.
- Castrillon, D. H., L. Miao, et al. (2003). "Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a." Science **301**(5630): 215-8.

- Cate, R. L., R. J. Mattaliano, et al. (1986). "Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells." Cell **45**(5): 685-98.
- Catlin, E. A., V. C. Tonnu, et al. (1997). "Mullerian inhibiting substance inhibits branching morphogenesis and induces apoptosis in fetal rat lung." Endocrinology **138**(2): 790-6.
- Cha, J., X. Sun, et al. (2012). "Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy." Nat Med **18**(12): 1754-67.
- Chacko, B. M., B. Qin, et al. (2001). "The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization." Nat Struct Biol **8**(3): 248-53.
- Chalmel, F. and M. Primig (2008). "The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology." BMC Bioinformatics **9**: 86.
- Chamero, P., T. Leinders-Zufall, et al. (2012). "From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ." Trends Neurosci **35**(10): 597-606.
- Chang, H., C. W. Brown, et al. (2002). "Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily." Endocr Rev **23**(6): 787-823.
- Chang, H., F. Guillou, et al. (2009). "Overactive beta-catenin signaling causes testicular sertoli cell tumor development in the mouse." Biol Reprod **81**(5): 842-9.
- Chang, H., D. Huylebroeck, et al. (1999). "Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects." Development **126**(8): 1631-42.
- Chang, H. and M. M. Matzuk (2001). "Smad5 is required for mouse primordial germ cell development." Mech Dev **104**(1-2): 61-7.
- Chassot, A. A., E. P. Gregoire, et al. (2008). "Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player." Sex Dev **2**(4-5): 219-27.
- Cheifetz, S., T. Bellon, et al. (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells." J Biol Chem **267**(27): 19027-30.
- Chen, C., S. M. Ware, et al. (2006). "The Vg1-related protein Gdf3 acts in a Nodal signaling pathway in the pre-gastrulation mouse embryo." Development **133**(2): 319-29.
- Chen, H., S. Shi, et al. (2004). "BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis." Development **131**(9): 2219-31.
- Chen, Q., H. Chen, et al. (2009). "Smad7 is required for the development and function of the heart." J Biol Chem **284**(1): 292-300.
- Chen, Y. G., F. Liu, et al. (1997). "Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12." EMBO J **16**(13): 3866-76.
- Cheng, S. K., F. Olale, et al. (2003). "EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1." Genes Dev **17**(1): 31-6.
- Chin, T. W., R. L. Parry, et al. (1991). "Human mullerian inhibiting substance inhibits tumor growth in vitro and in vivo." Cancer Res **51**(8): 2101-6.
- Chu, J., J. Ding, et al. (2005). "Non-cell-autonomous role for Cripto in axial midline formation during vertebrate embryogenesis." Development **132**(24): 5539-51.

- Clarke, T. R., Y. Hoshiya, et al. (2001). "Mullerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression." Mol Endocrinol **15**(6): 946-59.
- Clendenning, D. E. and D. P. Mortlock (2012). "The BMP ligand Gdf6 prevents differentiation of coronal suture mesenchyme in early cranial development." PLoS One **7**(5): e36789.
- Clevers, H. and R. Nusse (2012). "Wnt/beta-catenin signaling and disease." Cell **149**(6): 1192-205.
- Cohen-Hagueneau, O., J. Y. Picard, et al. (1987). "Mapping of the gene for anti-mullerian hormone to the short arm of human chromosome 19." Cytogenet Cell Genet **44**(1): 2-6.
- Compton, L. A., D. A. Potash, et al. (2007). "Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor." Circ Res **101**(8): 784-91.
- Conlon, F. L., K. M. Lyons, et al. (1994). "A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse." Development **120**(7): 1919-28.
- Corradini, E., J. L. Babitt, et al. (2009). "The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors." Cytokine Growth Factor Rev **20**(5-6): 389-98.
- d'Anglemont de Tassigny, X., L. A. Fagg, et al. (2007). "Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10714-9.
- Dalton, S. R. and A. Bellacosa (2012). "DNA demethylation by TDG." Epigenomics **4**(4): 459-67.
- Daluiski, A., T. Engstrand, et al. (2001). "Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density." Nat Genet **27**(1): 84-8.
- David, L., C. Mallet, et al. (2007). "Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells." Blood **109**(5): 1953-61.
- De Santa Barbara, P., N. Bonneaud, et al. (1998). "Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene." Mol Cell Biol **18**(11): 6653-65.
- de Santa Barbara, P., B. Moniot, et al. (1998). "Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-mullerian hormone receptor." J Biol Chem **273**(45): 29654-60.
- de Sousa Lopes, S. M., B. A. Roelen, et al. (2004). "BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo." Genes Dev **18**(15): 1838-49.
- de Vet, A., J. S. Laven, et al. (2002). "Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging." Fertil Steril **77**(2): 357-62.
- deMoura, M. D., D. Choi, et al. (1997). "Insulin-like growth factor-I-mediated amplification of follicle-stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: enhancement of steroidogenic enzyme activity and expression." Biol Reprod **56**(4): 946-53.
- Dewailly, D., C. Y. Andersen, et al. (2014). "The physiology and clinical utility of anti-

- Mullerian hormone in women." Hum Reprod Update.
- di Clemente, N., B. Goxe, et al. (1994). "Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries." Endocrine **2**(6): 553-558.
- di Clemente, N., S. P. Jamin, et al. (2010). "Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF- β ." Mol Endocrinol **24**(11): 2193-206.
- di Clemente, N., C. Wilson, et al. (1994). "Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Mullerian hormone." Mol Endocrinol **8**(8): 1006-20.
- Di Giacomo, M., M. Barchi, et al. (2005). "Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 737-42.
- Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, et al. (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signalling and turnover." Nat Cell Biol **5**(5): 410-21.
- Ding, J., L. Yang, et al. (1998). "Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo." Nature **395**(6703): 702-7.
- Dissen, G. A., C. Romero, et al. (2001). "Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary." Endocrinology **142**(5): 2078-86.
- Dixit, H., K. L. Rao, et al. (2006). "Mutational analysis of the betaglycan gene-coding region in susceptibility for ovarian failure." Hum Reprod **21**(8): 2041-6.
- Dolleman, M., M. Depmann, et al. (2014). "Anti-Mullerian hormone is a more accurate predictor of individual time to menopause than mother's age at menopause." Hum Reprod.
- Donahoe, P. K., Y. Ito, et al. (1976). "The production of Mullerian inhibiting substance by the fetal, neonatal and adult rat." Biol Reprod **15**(3): 329-34.
- Donahoe, P. K., Y. Ito, et al. (1977). "Mullerian inhibiting substance activity in bovine fetal, newborn and prepubertal testes." Biol Reprod **16**(2): 238-43.
- Dong, J., D. F. Albertini, et al. (1996). "Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis." Nature **383**(6600): 531-5.
- Donnelly, K. M., A. T. Fazleabas, et al. (1991). "Cloning of a recombinant complementary DNA to a baboon (*Papio anubis*) estradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein." Mol Endocrinol **5**(3): 356-64.
- Dresser, D. W., A. Hacker, et al. (1995). "The genes for a spliceosome protein (SAP62) and the anti-Mullerian hormone (AMH) are contiguous." Hum Mol Genet **4**(9): 1613-8.
- Dudas, M., S. Sridurongrit, et al. (2004). "Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells." Mech Dev **121**(2): 173-82.
- Dunn, N. R., G. E. Winnier, et al. (1997). "Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4." Dev Biol **188**(2): 235-47.
- Dupont, S., A. Krust, et al. (2000). "Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes."

Development **127**(19): 4277-91.

- Durlinger, A. L., M. J. Gruijters, et al. (2002). "Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary." Endocrinology **143**(3): 1076-84.
- Durlinger, A. L., M. J. Gruijters, et al. (2001). "Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary." Endocrinology **142**(11): 4891-9.
- Durlinger, A. L., P. Kramer, et al. (1999). "Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary." Endocrinology **140**(12): 5789-96.
- Dutertre, M., L. Gouédard, et al. (2001). "Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Mullerian hormone in transgenic mice." Endocrinology **142**(9): 4040-6.
- Dutertre, M., R. Rey, et al. (1997). "A mouse Sertoli cell line expressing anti-Mullerian hormone and its type II receptor." Mol Cell Endocrinol **136**(1): 57-65.
- Edson, M. A., A. K. Nagaraja, et al. (2009). "The mammalian ovary from genesis to revelation." Endocr Rev **30**(6): 624-712.
- Edson, M. A., R. L. Nalam, et al. (2010). "Granulosa cell-expressed BMPRI A and BMPRI B have unique functions in regulating fertility but act redundantly to suppress ovarian tumor development." Mol Endocrinol **24**(6): 1251-66.
- Enqvist, K., J. Ignatius, et al. (1992). "Nucleation and bubble growth in a first-order cosmological electroweak phase transition." Phys Rev D Part Fields **45**(10): 3415-3428.
- Erickson, G. F., D. A. Magoffin, et al. (1985). "The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships." Endocr Rev **6**(3): 371-99.
- Ewen, K. A. and P. Koopman (2010). "Mouse germ cell development: from specification to sex determination." Mol Cell Endocrinol **323**(1): 76-93.
- Fanchin, R., D. H. Mendez Lozano, et al. (2007). "Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization." J Clin Endocrinol Metab **92**(5): 1796-802.
- Fanchin, R., L. M. Schonauer, et al. (2003). "Serum anti-Mullerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3." Hum Reprod **18**(2): 323-7.
- Fanchin, R., J. Taieb, et al. (2005). "High reproducibility of serum anti-Mullerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assessment of ovarian follicular status." Hum Reprod **20**(4): 923-7.
- Farini, D., G. La Sala, et al. (2007). "Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells." Dev Biol **306**(2): 572-83.
- Finnson, K. W., B. Y. Tam, et al. (2006). "Identification of CD109 as part of the TGF-beta receptor system in human keratinocytes." FASEB J **20**(9): 1525-7.
- Folch, M., I. Pigem, et al. (2000). "Mullerian agenesis: etiology, diagnosis, and management." Obstet Gynecol Surv **55**(10): 644-9.
- Fortune, J. E. (2003). "The early stages of follicular development: activation of primordial

- follicles and growth of preantral follicles." Anim Reprod Sci **78**(3-4): 135-63.
- Fujii, G. H., A. M. Morimoto, et al. (1999). "Transcriptional analysis of the PTEN/MMAC1 pseudogene, psiPTEN." Oncogene **18**(9): 1765-9.
- Fujino, A., N. A. Arango, et al. (2009). "Cell migration and activated PI3K/AKT-directed elongation in the developing rat Mullerian duct." Dev Biol **325**(2): 351-62.
- Galloway, S. M., K. P. McNatty, et al. (2000). "Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner." Nat Genet **25**(3): 279-83.
- Galvin, K. M., M. J. Donovan, et al. (2000). "A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system." Nat Genet **24**(2): 171-4.
- Gao, Q. and J. E. Womack (1997). "Comparative mapping of anchor loci from HSA19 to cattle chromosomes 7 and 18." J Hered **88**(6): 524-7.
- Ge, L., H. S. Sui, et al. (2008). "Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events." Fertil Steril **90**(6): 2376-88.
- Gilmore, T. D. (2006). "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives." Oncogene **25**(51): 6680-4.
- Giuli, G., W. H. Shen, et al. (1997). "The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo." Development **124**(9): 1799-807.
- Godin, I. and C. C. Wylie (1991). "TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture." Development **113**(4): 1451-7.
- Gouédard, L., Y. G. Chen, et al. (2000). "Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Mullerian hormone and its type II receptor." J Biol Chem **275**(36): 27973-8.
- Gray, P. C. and W. Vale (2012). "Cripto/GRP78 modulation of the TGF-beta pathway in development and oncogenesis." FEBS Lett **586**(14): 1836-45.
- Greenfeld, C. R., J. K. Babus, et al. (2007). "BAX is involved in regulating follicular growth, but is dispensable for follicle atresia in adult mouse ovaries." Reproduction **133**(1): 107-16.
- Greenfeld, C. R., M. E. Pepling, et al. (2007). "BAX regulates follicular endowment in mice." Reproduction **133**(5): 865-76.
- Grynberg, M., A. Pierre, et al. (2012). "Differential regulation of ovarian anti-mullerian hormone (AMH) by estradiol through alpha- and beta-estrogen receptors." J Clin Endocrinol Metab **97**(9): E1649-57.
- Gu, Z., M. Nomura, et al. (1998). "The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse." Genes Dev **12**(6): 844-57.
- Gu, Z., E. M. Reynolds, et al. (1999). "The type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2) is required for gastrulation of the mouse embryo." Development **126**(11): 2551-61.
- Gupta, V., G. Yeo, et al. (2007). "Mullerian-inhibiting substance induces Gro-beta expression

- in breast cancer cells through a nuclear factor-kappaB-dependent and Smad1-dependent mechanism." Cancer Res **67**(6): 2747-56.
- Ha, T. U., D. L. Segev, et al. (2000). "Mullerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb-independent mechanism." J Biol Chem **275**(47): 37101-9.
- Hacker, A., B. Capel, et al. (1995). "Expression of Sry, the mouse sex determining gene." Development **121**(6): 1603-14.
- Halbrooks, P. J., R. Ding, et al. (2007). "Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling." J Mol Signal **2**: 4.
- Haqq, C., M. M. Lee, et al. (1992). "Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance." Genomics **12**(4): 665-9.
- Haqq, C. M., C. Y. King, et al. (1994). "Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY." Science **266**(5190): 1494-500.
- Hayashi, K., T. Kobayashi, et al. (2002). "SMAD1 signaling is critical for initial commitment of germ cell lineage from mouse epiblast." Mech Dev **118**(1-2): 99-109.
- Hayashi, M., H. Shima, et al. (1984). "Immunocytochemical localization of Mullerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody." J Histochem Cytochem **32**(6): 649-54.
- Hazout, A. (2006). "[Quality of ovarian reserve: inhibin B on day 3 of the cycle or antimullerian hormone (AMH)?]." Gynecol Obstet Fertil **34**(11): 1001-2.
- Hernandez Gifford, J. A., M. E. Hunzicker-Dunn, et al. (2009). "Conditional deletion of beta-catenin mediated by Amhr2cre in mice causes female infertility." Biol Reprod **80**(6): 1282-92.
- Heuckeroth, R. O., H. Enomoto, et al. (1999). "Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons." Neuron **22**(2): 253-63.
- Hillier, S. G., E. L. Yong, et al. (1991). "Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells." Mol Cell Endocrinol **75**(2): R1-6.
- Hinckley, M., S. Vaccari, et al. (2005). "The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes." Dev Biol **287**(2): 249-61.
- Hirobe, S., W. W. He, et al. (1994). "Mullerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection." Biol Reprod **50**(6): 1238-43.
- Hong, C. Y., J. H. Park, et al. (2003). "Expression of MIS in the testis is downregulated by tumor necrosis factor alpha through the negative regulation of SF-1 transactivation by NF-kappa B." Mol Cell Biol **23**(17): 6000-12.
- Honma, Y., T. Araki, et al. (2002). "Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons." Neuron **35**(2): 267-82.
- Horseman, N. D., W. Zhao, et al. (1997). "Defective mammopoiesis, but normal

- hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene." EMBO J **16**(23): 6926-35.
- Hoshiya, Y., V. Gupta, et al. (2003). "Mullerian Inhibiting Substance induces NFkB signaling in breast and prostate cancer cells." Mol Cell Endocrinol **211**(1-2): 43-9.
- Hsu, S. Y., R. J. Lai, et al. (1996). "Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis." Endocrinology **137**(11): 4837-43.
- Huang, F. W., J. L. Pinkus, et al. (2005). "A mouse model of juvenile hemochromatosis." J Clin Invest **115**(8): 2187-91.
- Huang, S., B. Tang, et al. (2002). "Conditional knockout of the Smad1 gene." Genesis **32**(2): 76-9.
- Ikeda, Y., D. S. Lala, et al. (1993). "Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression." Mol Endocrinol **7**(7): 852-60.
- Ikeda, Y., W. H. Shen, et al. (1994). "Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases." Mol Endocrinol **8**(5): 654-62.
- Imbeaud, S., C. Belville, et al. (1996). "A 27 base-pair deletion of the anti-Mullerian type II receptor gene is the most common cause of the persistent mullerian duct syndrome." Hum Mol Genet **5**(9): 1269-77.
- Imbeaud, S., E. Faure, et al. (1995). "Insensitivity to anti-mullerian hormone due to a mutation in the human anti-mullerian hormone receptor." Nat Genet **11**(4): 382-8.
- Ingraham, H. A., Y. Hirokawa, et al. (2000). "Autocrine and paracrine Mullerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction." Recent Prog Horm Res **55**: 53-67; discussion 67-8.
- Ishisaki, A., K. Yamato, et al. (1999). "Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells." J Biol Chem **274**(19): 13637-42.
- Itoh, S., M. Landstrom, et al. (1998). "Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7." J Biol Chem **273**(44): 29195-201.
- Izzi, L. and L. Attisano (2004). "Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation." Oncogene **23**(11): 2071-8.
- Jamin, S. P., N. A. Arango, et al. (2002). "Requirement of Bmpr1a for Mullerian duct regression during male sexual development." Nat Genet **32**(3): 408-10.
- Jena, N., C. Martin-Seisdedos, et al. (1997). "BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye." Exp Cell Res **230**(1): 28-37.
- Johnson, J., J. Bagley, et al. (2005). "Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood." Cell **122**(2): 303-15.
- Johnson, J., J. Canning, et al. (2004). "Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary." Nature **428**(6979): 145-50.
- Jonard, S. and D. Dewailly (2004). "The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-

- ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest." Hum Reprod Update **10**(2): 107-17.
- Jones, R. L., J. K. Findlay, et al. (2006). "Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion." Endocrinology **147**(2): 724-32.
- Jones, R. L., L. A. Salamonsen, et al. (2002). "Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro." J Clin Endocrinol Metab **87**(8): 4001-4.
- Jonk, L. J., S. Itoh, et al. (1998). "Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer." J Biol Chem **273**(33): 21145-52.
- Jornvall, H., E. Reissmann, et al. (2004). "ALK7, a receptor for nodal, is dispensable for embryogenesis and left-right patterning in the mouse." Mol Cell Biol **24**(21): 9383-9.
- Josso, N., C. Belville, et al. (2005). "AMH and AMH receptor defects in persistent Mullerian duct syndrome." Hum Reprod Update **11**(4): 351-6.
- Josso, N. and N. Clemente (2003). "Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family." Trends Endocrinol Metab **14**(2): 91-7.
- Josso, N. and N. di Clemente (2003). "Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family." Trends Endocrinol Metab **14**(2): 91-7.
- Josso, N., R. A. Rey, et al. (2013). "Anti-Mullerian Hormone: A Valuable Addition to the Toolbox of the Pediatric Endocrinologist." Int J Endocrinol **2013**: 674105.
- Jost, A. (1953). "Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones." Rec Progr Horm Res **8**: 379-418.
- Kang, Y., C. R. Chen, et al. (2003). "A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells." Mol Cell **11**(4): 915-26.
- Kashimada, K. and P. Koopman (2010). "Sry: the master switch in mammalian sex determination." Development **137**(23): 3921-30.
- Kenner, L., A. Hoebertz, et al. (2004). "Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects." J Cell Biol **164**(4): 613-23.
- Khalaf, M., J. Morera, et al. (2013). "BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis." Eur J Endocrinol **168**(3): 437-44.
- Kikuchi, A., H. Yamamoto, et al. (2011). "New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation." Int Rev Cell Mol Biol **291**: 21-71.
- Kim, J., K. Johnson, et al. (1997). "Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic." Nature **388**(6639): 304-8.
- King, T. R., B. K. Lee, et al. (1991). "Mapping anti-mullerian hormone (Amh) and related sequences in the mouse: identification of a new region of homology between MMU10 and HSA19p." Genomics **11**(2): 273-83.
- Kirkbride, K. C., T. A. Townsend, et al. (2008). "Bone morphogenetic proteins signal through

- the transforming growth factor-beta type III receptor." J Biol Chem **283**(12): 7628-37.
- Klattig, J., R. Sierig, et al. (2007). "Wilms' tumor protein Wt1 is an activator of the anti-Mullerian hormone receptor gene *Amhr2*." Mol Cell Biol **27**(12): 4355-64.
- Knebelmann, B., L. Boussin, et al. (1991). "Anti-Mullerian hormone Bruxelles: a nonsense mutation associated with the persistent Mullerian duct syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3767-71.
- Knight, P. G. and C. Glistler (2001). "Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary." Reproduction **121**(4): 503-12.
- Knight, P. G., L. Satchell, et al. (2012). "Intra-ovarian roles of activins and inhibins." Mol Cell Endocrinol **359**(1-2): 53-65.
- Knudson, C. M., K. S. Tung, et al. (1995). "Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death." Science **270**(5233): 96-9.
- Kobayashi, A. and R. R. Behringer (2003). "Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals." Nat Rev Genet **4**(12): 969-80.
- Kobayashi, A., K. M. Kwan, et al. (2005). "Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development." Development **132**(12): 2809-23.
- Kobayashi, A., W. Shawlot, et al. (2004). "Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development." Development **131**(3): 539-49.
- Kobayashi, A., C. A. Stewart, et al. (2011). "beta-Catenin is essential for Mullerian duct regression during male sexual differentiation." Development **138**(10): 1967-75.
- Kodama, A., O. Yoshino, et al. (2010). "Progesterone decreases bone morphogenetic protein (BMP) 7 expression and BMP7 inhibits decidualization and proliferation in endometrial stromal cells." Hum Reprod **25**(3): 751-6.
- Komiya, H., T. Onuma, et al. (1996). "In situ localization of messenger ribonucleic acid for an oviduct-specific glycoprotein during various hormonal conditions in the golden hamster." Biol Reprod **55**(5): 1107-18.
- Koninger, A., A. Kauth, et al. (2013). "Anti-Mullerian-hormone levels during pregnancy and postpartum." Reprod Biol Endocrinol **11**: 60.
- Koopman, P., A. Munsterberg, et al. (1990). "Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation." Nature **348**(6300): 450-2.
- Kouba, A. J., L. R. Abeydeera, et al. (2000). "Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro." Biol Reprod **63**(1): 242-50.
- Koubova, J., D. B. Menke, et al. (2006). "Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2474-9.
- Kreidberg, J. A., H. Sariola, et al. (1993). "WT-1 is required for early kidney development." Cell **74**(4): 679-91.
- Kumar, T. R., Y. Wang, et al. (1997). "Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility." Nat Genet **15**(2): 201-4.

- Kumar, T. R., A. L. Wiseman, et al. (2000). "Reproductive defects in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice." Endocrinology **141**(11): 4270-7.
- Kurimoto, K., M. Yamaji, et al. (2008). "Specification of the germ cell lineage in mice: a process orchestrated by the PR-domain proteins, Blimp1 and Prdm14." Cell Cycle **7**(22): 3514-8.
- La Marca, A., S. Giulini, et al. (2007). "Anti-Mullerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology." Hum Reprod **22**(3): 766-71.
- La Marca, A. and A. Volpe (2006). "Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool?" Clin Endocrinol (Oxf) **64**(6): 603-10.
- Lahbib-Mansais, Y., A. Barbosa, et al. (1997). "Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19." Cytogenet Cell Genet **76**(1-2): 109-14.
- Lala, D. S., D. A. Rice, et al. (1992). "Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I." Mol Endocrinol **6**(8): 1249-58.
- Larsson, J., M. J. Goumans, et al. (2001). "Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice." EMBO J **20**(7): 1663-73.
- Lau, A. L., T. R. Kumar, et al. (2000). "Activin betaC and betaE genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration." Mol Cell Biol **20**(16): 6127-37.
- Laurich, V. M., A. M. Trbovich, et al. (2002). "Mullerian inhibiting substance blocks the protein kinase A-induced expression of cytochrome p450 17alpha-hydroxylase/C(17-20) lyase mRNA in a mouse Leydig cell line independent of cAMP responsive element binding protein phosphorylation." Endocrinology **143**(9): 3351-60.
- Lawson, K. A., N. R. Dunn, et al. (1999). "Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo." Genes Dev **13**(4): 424-36.
- Lawson, K. A. and W. J. Hage (1994). "Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse." Ciba Found Symp **182**: 68-84; discussion 84-91.
- Le Goascogne, C., N. Sananes, et al. (1991). "Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain." J Reprod Fertil **93**(2): 609-22.
- Lebeurrier, N., S. Launay, et al. (2008). "Anti-Mullerian-hormone-dependent regulation of the brain serine-protease inhibitor neuroserpin." J Cell Sci **121**(Pt 20): 3357-65.
- Lebrun, J. J. and W. W. Vale (1997). "Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation." Mol Cell Biol **17**(3): 1682-91.
- Lee, K. J., M. Mendelsohn, et al. (1998). "Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord." Genes Dev **12**(21): 3394-407.
- Lee, K. Y., J. W. Jeong, et al. (2007). "Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response." Mol Cell Biol **27**(15): 5468-78.

- Lee, M. M., R. L. Cate, et al. (1992). "Developmentally regulated polyadenylation of two discrete messenger ribonucleic acids for mullerian inhibiting substance." Endocrinology **130**(2): 847-53.
- Lee, W. S., F. Otsuka, et al. (2001). "Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat." Biol Reprod **65**(4): 994-9.
- Leighton, J. K., S. Canning, et al. (1995). "Expression of cytochrome P450 1A1, an estrogen hydroxylase, in ovarian granulosa cells is developmentally regulated." J Steroid Biochem Mol Biol **52**(4): 351-6.
- Lewis, K. A., P. C. Gray, et al. (2000). "Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling." Nature **404**(6776): 411-4.
- Li, J., L. Ye, et al. (2012). "Repulsive guidance molecules, novel bone morphogenetic protein co-receptors, are key regulators of the growth and aggressiveness of prostate cancer cells." Int J Oncol **40**(2): 544-50.
- Li, R., A. Rosendahl, et al. (2006). "Deletion of exon I of SMAD7 in mice results in altered B cell responses." J Immunol **176**(11): 6777-84.
- Li, Y. Q., P. Z. Zhou, et al. (2007). "Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair." Nucleic Acids Res **35**(2): 390-400.
- Litvinov, I. V., A. A. Bizet, et al. (2011). "CD109 release from the cell surface in human keratinocytes regulates TGF-beta receptor expression, TGF-beta signalling and STAT3 activation: relevance to psoriasis." Exp Dermatol **20**(8): 627-32.
- Liu, F., A. Hata, et al. (1996). "A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator." Nature **381**(6583): 620-3.
- Liu, X., K. Andoh, et al. (1999). "A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice." Endocrinology **140**(6): 2480-5.
- Lopez-Casillas, F., J. L. Wrana, et al. (1993). "Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor." Cell **73**(7): 1435-44.
- Lopez-Novoa, J. M. and C. Bernabeu (2010). "The physiological role of endoglin in the cardiovascular system." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(4): H959-74.
- Lowe, L. A., S. Yamada, et al. (2001). "Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo." Development **128**(10): 1831-43.
- Lukas-Croisier, C., C. Lasala, et al. (2003). "Follicle-stimulating hormone increases testicular Anti-Mullerian hormone (AMH) production through sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH Gene." Mol Endocrinol **17**(4): 550-61.
- Luo, X., Y. Ikeda, et al. (1995). "A cell-specific nuclear receptor plays essential roles in adrenal and gonadal development." Endocr Res **21**(1-2): 517-24.
- Luo, X., Y. Ikeda, et al. (1994). "A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation." Cell **77**(4): 481-90.
- Luoh, S. W., P. A. Bain, et al. (1997). "Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice." Development **124**(11): 2275-84.

- Lynch, J. P., D. S. Lala, et al. (1993). "Steroidogenic factor 1, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues." Mol Endocrinol **7**(6): 776-86.
- Magre, S. and A. Jost (1991). "Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus." J Electron Microsc Tech **19**(2): 172-88.
- Magre, S. and B. Vigier (2006). Développement et différenciation sexuelle de l'appareil génital La reproduction chez les Mammifères et l'Homme. C. Thibault and M. C. Levasseur, Ellipses-INRA éditions: 235-255.
- Mahadevaiah, S. K., J. M. Turner, et al. (2001). "Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis." Nat Genet **27**(3): 271-6.
- Maresh, G. A., T. M. Timmons, et al. (1990). "Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins." Biol Reprod **43**(6): 965-76.
- Martel, C., D. Gagne, et al. (1994). "Rapid modulation of ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase gene expression by prolactin and human chorionic gonadotropin in the hypophysectomized rat." Mol Cell Endocrinol **99**(1): 63-71.
- Martus, N. S., H. G. Verhage, et al. (1998). "Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein." J Reprod Fertil **113**(2): 323-9.
- Masiakos, P. T., D. T. MacLaughlin, et al. (1999). "Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS." Clin Cancer Res **5**(11): 3488-99.
- Masood, D. E., E. C. Roach, et al. (2010). "Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease." Curr Drug Metab **11**(8): 693-714.
- Massague, J. (2012). "TGF-beta signaling in development and disease." FEBS Lett **586**(14): 1833.
- Massague, J. (2012). "TGFbeta signalling in context." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(10): 616-30.
- Massague, J. and R. R. Gomis (2006). "The logic of TGFbeta signaling." FEBS Lett **580**(12): 2811-20.
- Massague, J., J. Seoane, et al. (2005). "Smad transcription factors." Genes Dev **19**(23): 2783-810.
- Matzuk, M. M., L. Dionne, et al. (1998). "Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice." Endocrinology **139**(9): 4008-11.
- Matzuk, M. M., M. J. Finegold, et al. (1992). "Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice." Nature **360**(6402): 313-9.
- Matzuk, M. M., T. R. Kumar, et al. (1995). "Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II." Nature **374**(6520): 356-60.
- McAllister, K. A., K. M. Grogg, et al. (1994). "Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1." Nat Genet **8**(4): 345-51.
- McGee, E. A. and A. J. Hsueh (2000). "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles."

Endocr Rev **21**(2): 200-14.

- McLachlan, R. I., D. M. Robertson, et al. (1987). "Inhibin--a non-steroidal regulator of pituitary follicle stimulating hormone." Baillieres Clin Endocrinol Metab **1**(1): 89-112.
- McLaren, A. (1991). "Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage." Bioessays **13**(4): 151-6.
- McLaren, A. (1991). "Sex determination. The making of male mice." Nature **351**(6322): 96.
- McLaren, A. (1992). "Development of primordial germ cells in the mouse." Andrologia **24**(5): 243-7.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, et al. (1997). "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." Nature **387**(6628): 83-90.
- McPherron, A. C., A. M. Lawler, et al. (1999). "Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11." Nat Genet **22**(3): 260-4.
- Mehlmann, L. M. (2005). "Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation." Reproduction **130**(6): 791-9.
- Memon, M. A., M. D. Anway, et al. (2008). "Transforming growth factor beta (TGFbeta1, TGFbeta2 and TGFbeta3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development." Mol Cell Endocrinol **294**(1-2): 70-80.
- Meno, C., K. Gritsman, et al. (1999). "Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation." Mol Cell **4**(3): 287-98.
- Meno, C., A. Shimono, et al. (1998). "lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal." Cell **94**(3): 287-97.
- Messika-Zeitoun, L., L. Gouédard, et al. (2001). "Autosomal recessive segregation of a truncating mutation of anti-Mullerian type II receptor in a family affected by the persistent Mullerian duct syndrome contrasts with its dominant negative activity in vitro." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4390-7.
- Micevych, P. and K. Sinchak (2011). "The Neurosteroid Progesterone Underlies Estrogen Positive Feedback of the LH Surge." Front Endocrinol (Lausanne) **2**: 90.
- Mihm, M., S. Gangooly, et al. (2011). "The normal menstrual cycle in women." Anim Reprod Sci **124**(3-4): 229-36.
- Mii, S., Y. Murakumo, et al. (2012). "Epidermal hyperplasia and appendage abnormalities in mice lacking CD109." Am J Pathol **181**(4): 1180-9.
- Miller, C. and D. A. Sassoon (1998). "Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract." Development **125**(16): 3201-11.
- Mishina, Y., R. Crombie, et al. (1999). "Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis." Dev Biol **213**(2): 314-26.
- Mishina, Y., M. C. Hanks, et al. (2002). "Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice." Genesis **32**(2): 69-72.
- Mishina, Y., R. Rey, et al. (1996). "Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance

- signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation." Genes Dev **10**(20): 2577-87.
- Mishina, Y., A. Suzuki, et al. (1995). "Genomic organization and chromosomal location of the mouse type I BMP-2/4 receptor." Biochem Biophys Res Commun **206**(1): 310-7.
- Mishina, Y., A. Suzuki, et al. (1995). "Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis." Genes Dev **9**(24): 3027-37.
- Mishina, Y., R. Tizard, et al. (1997). "Sequence, genomic organization, and chromosomal location of the mouse Mullerian-inhibiting substance type II receptor gene." Biochem Biophys Res Commun **237**(3): 741-6.
- Mitchell, J. A. and S. J. Lye (2002). "Differential expression of activator protein-1 transcription factors in pregnant rat myometrium." Biol Reprod **67**(1): 240-6.
- Miyamoto, N., M. Yoshida, et al. (1997). "Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*." Development **124**(9): 1653-64.
- Molyneaux, K. A., H. Zinszner, et al. (2003). "The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival." Development **130**(18): 4279-86.
- Moniruzzaman, M. and T. Miyano (2010). "Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals." J Reprod Dev **56**(6): 559-66.
- Monniaux, D., A. Caraty, et al. (2009). "Ovarian follicular development and ovulation in mammals." Productions Animales **22**(2): 59-76.
- Monniaux, D., C. Huet, et al. (1997). "Follicular growth and ovarian dynamics in mammals." J Reprod Fertil Suppl **51**: 3-23.
- Monnier, P. P., A. Sierra, et al. (2002). "RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons." Nature **419**(6905): 392-5.
- Morinaga, C., D. Saito, et al. (2007). "The *hotei* mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9691-6.
- Mork, L., D. M. Maatouk, et al. (2012). "Temporal differences in granulosa cell specification in the ovary reflect distinct follicle fates in mice." Biol Reprod **86**(2): 37.
- Morohashi, K., U. M. Zanger, et al. (1993). "Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP." Mol Endocrinol **7**(9): 1196-204.
- Mueller, B. K., T. Yamashita, et al. (2006). "The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1513-29.
- Munsterberg, A. and R. Lovell-Badge (1991). "Expression of the mouse anti-Mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation." Development **113**(2): 613-24.
- Nachtigal, M. W., Y. Hirokawa, et al. (1998). "Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression." Cell **93**(3): 445-54.

- Nachtigal, M. W. and H. A. Ingraham (1996). "Bioactivation of Mullerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7711-6.
- Namkung, J., J. Y. Song, et al. (2012). "Mullerian inhibiting substance induces apoptosis of human endometrial stromal cells in endometriosis." J Clin Endocrinol Metab **97**(9): 3224-30.
- Nebert, D. W. and T. P. Dalton (2006). "The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis." Nat Rev Cancer **6**(12): 947-60.
- Neddermann, P., P. Gallinari, et al. (1996). "Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase." J Biol Chem **271**(22): 12767-74.
- Neddermann, P. and J. Jiricny (1993). "The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells." J Biol Chem **268**(28): 21218-24.
- Nef, S. and L. F. Parada (1999). "Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*." Nat Genet **22**(3): 295-9.
- Niederkofler, V., R. Salie, et al. (2004). "Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system." J Neurosci **24**(4): 808-18.
- Nilsson, E., N. Rogers, et al. (2007). "Actions of anti-Mullerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition." Reproduction **134**(2): 209-21.
- Nilsson, E. E., R. Schindler, et al. (2011). "Inhibitory actions of Anti-Mullerian Hormone (AMH) on ovarian primordial follicle assembly." PLoS One **6**(5): e20087.
- Nilsson, E. E. and M. K. Skinner (2003). "Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development." Biol Reprod **69**(4): 1265-72.
- Nolan-Stevaux, O., W. Zhong, et al. (2012). "Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies." PLoS One **7**(12): e50920.
- Nomura, M. and E. Li (1998). "Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development." Nature **393**(6687): 786-90.
- Norris, R. P., M. Freudzon, et al. (2010). "Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH." Reproduction **140**(5): 655-62.
- O'Day-Bowman, M. B., P. A. Mavrogianis, et al. (1996). "Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation." Biol Reprod **54**(1): 60-9.
- Oh, S. P. and E. Li (1997). "The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse." Genes Dev **11**(14): 1812-26.
- Okamura, D., K. Hayashi, et al. (2005). "Mouse epiblasts change responsiveness to BMP4

- signal required for PGC formation through functions of extraembryonic ectoderm." Mol Reprod Dev **70**(1): 20-9.
- Okawa, T., Y. Suzuki, et al. (1993). "Oxytocin, PGE2 and PGF2 alpha stimulate the production of inositol phosphates in the rabbit myometrium." Arch Gynecol Obstet **252**(3): 129-36.
- Oreal, E., C. Pieau, et al. (1998). "Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression." Dev Dyn **212**(4): 522-32.
- Orisaka, M., K. Tajima, et al. (2009). "Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development." J Ovarian Res **2**(1): 9.
- Ormandy, C. J., M. Naylor, et al. (2003). "Investigation of the transcriptional changes underlying functional defects in the mammary glands of prolactin receptor knockout mice." Recent Prog Horm Res **58**: 297-323.
- Orvis, G. D. and R. R. Behringer (2007). "Cellular mechanisms of Mullerian duct formation in the mouse." Dev Biol **306**(2): 493-504.
- Orvis, G. D., S. P. Jamin, et al. (2008). "Functional redundancy of TGF- β family Type I receptors and receptor-Smads in mediating AMH-induced Müllerian duct regression in the mouse." Biol Reprod **78**(6): 994-1001.
- Oshima, M., H. Oshima, et al. (1996). "TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis." Dev Biol **179**(1): 297-302.
- Ozkaynak, E., D. F. Jin, et al. (1997). "Osteogenic protein-1 mRNA in the uterine endometrium." Biochem Biophys Res Commun **234**(1): 242-6.
- Pangas, S. A., X. Li, et al. (2008). "Conditional deletion of Smad1 and Smad5 in somatic cells of male and female gonads leads to metastatic tumor development in mice." Mol Cell Biol **28**(1): 248-57.
- Parakh, T. N., J. A. Hernandez, et al. (2006). "Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12435-40.
- Paria, B. C., W. Ma, et al. (2001). "Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 1047-52.
- Park, C. B., F. J. DeMayo, et al. (2012). "NODAL in the uterus is necessary for proper placental development and maintenance of pregnancy." Biol Reprod **86**(6): 194.
- Park, S. H. (2005). "Fine tuning and cross-talking of TGF-beta signal by inhibitory Smads." J Biochem Mol Biol **38**(1): 9-16.
- Parr, B. A., V. A. Cornish, et al. (2001). "Wnt7b regulates placental development in mice." Dev Biol **237**(2): 324-32.
- Parr, B. A. and A. P. McMahon (1998). "Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a." Nature **395**(6703): 707-10.
- Pask, A. J., D. J. Whitworth, et al. (2004). "Marsupial anti-Mullerian hormone gene structure, regulatory elements, and expression." Biol Reprod **70**(1): 160-7.
- Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway

- from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev **25**(6): 947-70.
- Pelletier, G., S. Li, et al. (2001). "Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads." J Endocrinol **171**(2): 373-83.
- Peng, J., Q. Li, et al. (2013). "Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(8): E776-85.
- Pepinsky, R. B., L. K. Sinclair, et al. (1988). "Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment." J Biol Chem **263**(35): 18961-4.
- Pepling, M. E. and A. C. Spradling (2001). "Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles." Dev Biol **234**(2): 339-51.
- Pesce, M., F. G. Klinger, et al. (2002). "Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by Bmp4 signalling." Mech Dev **112**(1-2): 15-24.
- Pfendler, K. C., J. Yoon, et al. (2000). "Nodal and bone morphogenetic protein 5 interact in murine mesoderm formation and implantation." Genesis **28**(1): 1-14.
- Picard, J. Y., R. Benarous, et al. (1986). "Cloning and expression of cDNA for anti-mullerian hormone." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(15): 5464-8.
- Picard, J. Y. and N. Josso (1984). "Purification of testicular anti-Mullerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor." Mol Cell Endocrinol **34**(1): 23-9.
- Picard, J. Y., D. Tran, et al. (1978). "Biosynthesis of labelled anti-mullerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure." Mol Cell Endocrinol **12**(1): 17-30.
- Pichel, J. G., L. Shen, et al. (1996). "Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF." Nature **382**(6586): 73-6.
- Picon, R. (1969). "[Action of the fetal testis on the development in vitro of the Mullerian ducts in the rat]." Arch Anat Microsc Morphol Exp **58**(1): 1-19.
- Pierre, A., M. Peigne, et al. (2013). "Loss of LH-induced down-regulation of anti-Mullerian hormone receptor expression may contribute to anovulation in women with polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **28**(3): 762-9.
- Pierreux, C. E., F. J. Nicolas, et al. (2000). "Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus." Mol Cell Biol **20**(23): 9041-54.
- Pigny, P., C. Cortet-Rudelli, et al. (2000). "Serum levels of inhibins are differentially altered in patients with polycystic ovary syndrome: effects of being overweight and relevance to hyperandrogenism." Fertil Steril **73**(5): 972-7.
- Pigny, P., E. Merlen, et al. (2003). "Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 5957-62.

- Pinilla, L., E. Aguilar, et al. (2012). "Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms." Physiol Rev **92**(3): 1235-316.
- Pink, R. C., K. Wicks, et al. (2011). "Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease?" RNA **17**(5): 792-8.
- Pouponnot, C., L. Jayaraman, et al. (1998). "Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP." J Biol Chem **273**(36): 22865-8.
- Prunskaitė-Hyyryläinen, R., J. Shan, et al. (2014). "Wnt4, a pleiotropic signal for controlling cell polarity, basement membrane integrity, and antimüllerian hormone expression during oocyte maturation in the female follicle." Faseb J.
- Quirk, S. M., R. G. Cowan, et al. (2004). "Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival." J Anim Sci **82 E-Suppl**: E40-52.
- Racine, C., R. Rey, et al. (1998). "Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 594-9.
- Radovick, S., J. E. Levine, et al. (2012). "Estrogenic regulation of the GnRH neuron." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 52.
- Rajakulendran, S., S. V. Tan, et al. (2010). "Muscle weakness, palpitations and a small chin: the Andersen-Tawil syndrome." Pract Neurol **10**(4): 227-31.
- Rajkovic, A., S. A. Pangas, et al. (2004). "NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression." Science **305**(5687): 1157-9.
- Rajpert-De Meyts, E., N. Jorgensen, et al. (1999). "Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells." J Clin Endocrinol Metab **84**(10): 3836-44.
- Rana, S., A. S. Cerdeira, et al. (2012). "Plasma concentrations of soluble endoglin versus standard evaluation in patients with suspected preeclampsia." PLoS One **7**(10): e48259.
- Renaud, E. J., D. T. MacLaughlin, et al. (2005). "Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Müllerian Inhibiting Substance." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 111-6.
- Resendes, B. L., S. H. Sohn, et al. (2001). "Role for anti-Müllerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina." Am J Med Genet **98**(2): 129-36.
- Rey, R., I. Lordereau-Richard, et al. (1993). "Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development." J Clin Endocrinol Metab **77**(5): 1220-6.
- Rey, R., F. Mebarki, et al. (1994). "Anti-müllerian hormone in children with androgen insensitivity." J Clin Endocrinol Metab **79**(4): 960-4.
- Rey, R., J. C. Sabourin, et al. (2000). "Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors." Hum Pathol **31**(10): 1202-8.
- Rey, R. A., C. Lhomme, et al. (1996). "Antimüllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: comparative study with serum alpha-inhibin and estradiol." Am J Obstet Gynecol **174**(3): 958-65.
- Ricard, N., D. Ciais, et al. (2012). "BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal

- vascular remodeling." Blood **119**(25): 6162-71.
- Richards, A. J., G. C. Enders, et al. (1999). "Activin and TGFbeta limit murine primordial germ cell proliferation." Dev Biol **207**(2): 470-5.
- Rico, C., C. Medigue, et al. (2011). "Regulation of anti-Mullerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels." Biol Reprod **84**(3): 560-71.
- Roberts, A. B. (1998). "Molecular and cell biology of TGF-beta." Miner Electrolyte Metab **24**(2-3): 111-9.
- Robinson, J. W., M. Zhang, et al. (2012). "Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes." Dev Biol **366**(2): 308-16.
- Rouiller-Fabre, V., S. Carmona, et al. (1998). "Effect of anti-Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats." Endocrinology **139**(3): 1213-20.
- Rucker, E. B., 3rd, P. Dierisseau, et al. (2000). "Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis." Mol Endocrinol **14**(7): 1038-52.
- Ruggiu, M., R. Speed, et al. (1997). "The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis." Nature **389**(6646): 73-7.
- Saitou, M. and M. Yamaji (2012). "Primordial germ cells in mice." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(11).
- Salmon, N. A., A. H. Handyside, et al. (2004). "Oocyte regulation of anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice." Dev Biol **266**(1): 201-8.
- Saloman, D. S., C. Bianco, et al. (2000). "The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer." Endocr Relat Cancer **7**(4): 199-226.
- Samad, T. A., A. Rebbapragada, et al. (2005). "DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor." J Biol Chem **280**(14): 14122-9.
- Schepers, G., M. Wilson, et al. (2003). "SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the Amh promoter in vitro." J Biol Chem **278**(30): 28101-8.
- Schmidt, D., C. E. Ovitt, et al. (2004). "The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance." Development **131**(4): 933-42.
- Schorpp-Kistner, M., Z. Q. Wang, et al. (1999). "JunB is essential for mammalian placentation." Embo J **18**(4): 934-48.
- Schulz, R. W., J. Bogerd, et al. (2007). "Estrogen-induced alterations in amh and dmrt1 expression signal for disruption in male sexual development in the zebrafish." Environ Sci Technol **41**(17): 6305-10.
- Sedes, L., A. Leclerc, et al. (2013). "Anti-Mullerian hormone recruits BMPR-IA in immature granulosa cells." PLoS One **8**(11): e81551.

- Segev, D. L., T. U. Ha, et al. (2000). "Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway." J Biol Chem **275**(37): 28371-9.
- Segev, D. L., Y. Hoshiya, et al. (2002). "Mullerian-inhibiting substance regulates NF-kappa B signaling in the prostate in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 239-44.
- Segev, D. L., Y. Hoshiya, et al. (2001). "Mullerian inhibiting substance regulates NFkappaB signaling and growth of mammary epithelial cells in vivo." J Biol Chem **276**(29): 26799-806.
- Seifer, D. B., D. T. MacLaughlin, et al. (2002). "Early follicular serum mullerian-inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles." Fertil Steril **77**(3): 468-71.
- Seminara, S. B., S. Messager, et al. (2003). "The GPR54 gene as a regulator of puberty." N Engl J Med **349**(17): 1614-27.
- Sendai, Y., H. Komiya, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein." Biol Reprod **53**(2): 285-94.
- Shawlot, W. and R. R. Behringer (1995). "Requirement for Lim1 in head-organizer function." Nature **374**(6521): 425-30.
- Shen, J. J., L. Huang, et al. (2009). "Deficiency of growth differentiation factor 3 protects against diet-induced obesity by selectively acting on white adipose." Mol Endocrinol **23**(1): 113-23.
- Shen, W. H., C. C. Moore, et al. (1994). "Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade." Cell **77**(5): 651-61.
- Shi, J., O. Yoshino, et al. (2009). "Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Mullerian hormone in human granulosa cells." Fertil Steril **92**(5): 1794-8.
- Shi, Y., Y. F. Wang, et al. (1998). "Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling." Cell **94**(5): 585-94.
- Shi, Z., N. Dragin, et al. (2010). "Organ-specific roles of CYP1A1 during detoxication of dietary benzo[a]pyrene." Mol Pharmacol **78**(1): 46-57.
- Shirazi, R., A. H. Zarnani, et al. (2012). "BMP4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells." Cell Biol Int **36**(12): 1185-93.
- Sirard, C., J. L. de la Pompa, et al. (1998). "The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo." Genes Dev **12**(1): 107-19.
- Skinner, M. K. (2005). "Regulation of primordial follicle assembly and development." Hum Reprod Update **11**(5): 461-71.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**: Article3.
- Snegovskikh, V., J. S. Park, et al. (2006). "Endocrinology of parturition." Endocrinol Metab

Clin North Am **35**(1): 173-91, viii.

- Song, J., S. P. Oh, et al. (1999). "The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice." Dev Biol **213**(1): 157-69.
- Sowers, M., D. McConnell, et al. (2010). "Anti-Mullerian hormone and inhibin B variability during normal menstrual cycles." Fertil Steril **94**(4): 1482-6.
- Soyal, S. M., A. Amleh, et al. (2000). "FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation." Development **127**(21): 4645-54.
- Stephen, A. E., P. T. Masiakos, et al. (2001). "Tissue-engineered cells producing complex recombinant proteins inhibit ovarian cancer in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3214-9.
- Stocco, C., C. Telleria, et al. (2007). "The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression." Endocr Rev **28**(1): 117-49.
- Stocco, D. M. (2001). "StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis." Annu Rev Physiol **63**: 193-213.
- Stoikos, C. J., C. A. Harrison, et al. (2008). "A distinct cohort of the TGFbeta superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization." Hum Reprod **23**(6): 1447-56.
- Streuli, I., T. Fraisse, et al. (2008). "Serum antimullerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids." Fertil Steril **90**(2): 395-400.
- Strizzi, L., C. Bianco, et al. (2005). "Cripto-1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis." Oncogene **24**(37): 5731-41.
- Subramanian, G., R. E. Schwarz, et al. (2004). "Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype1." Cancer Res **64**(15): 5200-11.
- Sugiura, K., Y. Q. Su, et al. (2010). "Does bone morphogenetic protein 6 (BMP6) affect female fertility in the mouse?" Biol Reprod **83**(6): 997-1004.
- Suo, G., J. Han, et al. (2005). "Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers." Biochem Biophys Res Commun **337**(4): 1047-51.
- Swain, A. and R. Lovell-Badge (1999). "Mammalian sex determination: a molecular drama." Genes Dev **13**(7): 755-67.
- Taieb, J., M. Grynberg, et al. (2011). "FSH and its second messenger cAMP stimulate the transcription of human anti-Mullerian hormone in cultured granulosa cells." Mol Endocrinol **25**(4): 645-55.
- Takahashi, M., M. Hayashi, et al. (1986). "The ontogeny of mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle." Biol Reprod **35**(2): 447-53.
- Takahashi, M., S. S. Koide, et al. (1986). "Mullerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor." Mol Cell Endocrinol **47**(3): 225-34.
- Tanwar, P. S., A. E. Commandeur, et al. (2012). "The Mullerian inhibiting substance type 2 receptor suppresses tumorigenesis in testes with sustained beta-catenin signaling." Carcinogenesis **33**(12): 2351-61.

- Tapanainen, J. S., T. Vaskivuo, et al. (1998). "Inactivating FSH receptor mutations and gonadal dysfunction." Mol Cell Endocrinol **145**(1-2): 129-35.
- Taylor, A. E., B. McCourt, et al. (1997). "Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **82**(7): 2248-56.
- Teixeira, J., E. Fynn-Thompson, et al. (1999). "Mullerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level." Endocrinology **140**(10): 4732-8.
- Teixeira, J., W. W. He, et al. (1996). "Developmental expression of a candidate mullerian inhibiting substance type II receptor." Endocrinology **137**(1): 160-5.
- Tomac, A. C., A. D. Agulnick, et al. (2002). "Effects of cerebral ischemia in mice deficient in Persephin." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9521-6.
- Tomic, D., S. G. Brodie, et al. (2002). "Smad 3 may regulate follicular growth in the mouse ovary." Biol Reprod **66**(4): 917-23.
- Tomizuka, K., K. Horikoshi, et al. (2008). "R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling." Hum Mol Genet **17**(9): 1278-91.
- Tong, X. H., L. M. Wu, et al. (2012). "Fertilization rates are improved after IVF if the corona radiata is left intact in vitrified-warmed human oocytes." Hum Reprod **27**(11): 3208-14.
- Torres, M., E. Gomez-Pardo, et al. (1995). "Pax-2 controls multiple steps of urogenital development." Development **121**(12): 4057-65.
- Tran, D. and N. Josso (1982). "Localization of anti-Mullerian hormone in the rough endoplasmic reticulum of the developing bovine sertoli cell using immunocytochemistry with a monoclonal antibody." Endocrinology **111**(5): 1562-7.
- Tran, D., N. Muesy-Dessole, et al. (1977). "Anti-Mullerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells." Nature **269**(5627): 411-2.
- Tremblay, J. J., N. M. Robert, et al. (2001). "Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells." Mol Endocrinol **15**(9): 1636-50.
- Tremblay, J. J. and R. S. Viger (2003). "Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis." J Steroid Biochem Mol Biol **85**(2-5): 291-8.
- Tremblay, K. D., N. R. Dunn, et al. (2001). "Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation." Development **128**(18): 3609-21.
- Tsai, V. W., L. Macia, et al. (2013). "TGF- β superfamily cytokine MIC-1/GDF15 is a physiological appetite and body weight regulator." PLoS One **8**(2): e55174.
- Tsuda, M., Y. Sasaoka, et al. (2003). "Conserved role of nanos proteins in germ cell development." Science **301**(5637): 1239-41.
- Tsukazaki, T., T. A. Chiang, et al. (1998). "SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor." Cell **95**(6): 779-91.
- Ueno, S., M. Takahashi, et al. (1989). "Cellular localization of mullerian inhibiting substance

- in the developing rat ovary." Endocrinology **124**(2): 1000-6.
- Umans, L., L. Vermeire, et al. (2003). "Generation of a floxed allele of Smad5 for cre-mediated conditional knockout in the mouse." Genesis **37**(1): 5-11.
- Urness, L. D., L. K. Sorensen, et al. (2000). "Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1." Nat Genet **26**(3): 328-31.
- Vainio, S., M. Heikkila, et al. (1999). "Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling." Nature **397**(6718): 405-9.
- van Rooij, I. A., F. J. Broekmans, et al. (2002). "Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve." Hum Reprod **17**(12): 3065-71.
- Vashee, S. and T. Kodadek (1995). "The activation domain of GAL4 protein mediates cooperative promoter binding with general transcription factors in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10683-7.
- Vassalli, A., M. M. Matzuk, et al. (1994). "Activin/inhibin beta B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction." Genes Dev **8**(4): 414-27.
- Vigier, B., M. G. Forest, et al. (1989). "Anti-Mullerian hormone produces endocrine sex reversal of fetal ovaries." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3684-8.
- Vigier, B., J. Y. Picard, et al. (1985). "Secretion of anti-Mullerian hormone by immature bovine Sertoli cells in primary culture, studied by a competition-type radioimmunoassay: lack of modulation by either FSH or testosterone." Mol Cell Endocrinol **43**(2-3): 141-50.
- Vigier, B., J. Y. Picard, et al. (1984). "Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells." Endocrinology **114**(4): 1315-20.
- Vigier, B., D. Tran, et al. (1984). "Origin of anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses." J Reprod Fertil **70**(2): 473-9.
- Visser, J. A., A. L. Durlinger, et al. (2007). "Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Mullerian hormone null mice." Endocrinology **148**(5): 2301-8.
- Visser, J. A., A. McLuskey, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human anti-Mullerian hormone type II receptor gene." Biochem Biophys Res Commun **215**(3): 1029-36.
- Visser, J. A., R. Olaso, et al. (2001). "The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling." Mol Endocrinol **15**(6): 936-45.
- Visser, J. A., I. Schipper, et al. (2012). "Anti-Mullerian hormone: an ovarian reserve marker in primary ovarian insufficiency." Nat Rev Endocrinol **8**(6): 331-41.
- Waldrip, W. R., E. K. Bikoff, et al. (1998). "Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo." Cell **92**(6): 797-808.
- Wang, C. F. and S. S. Yen (1975). "Direct evidence of estrogen modulation of pituitary sensitivity to luteinizing hormone-releasing factor during the menstrual cycle." J Clin Invest **55**(1): 201-4.

- Wang, J., C. Dicken, et al. (2009). "Evidence for a Mullerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium." Fertil Steril **91**(4): 1195-203.
- Wang, P. Y., K. Koishi, et al. (2005). "Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16421-5.
- Watanabe, K., T. R. Clarke, et al. (2000). "Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1624-9.
- Weenen, C., J. S. Laven, et al. (2004). "Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment." Mol Hum Reprod **10**(2): 77-83.
- Welt, C. K., Y. L. Pagan, et al. (2003). "Control of follicle-stimulating hormone by estradiol and the inhibins: critical role of estradiol at the hypothalamus during the luteal-follicular transition." J Clin Endocrinol Metab **88**(4): 1766-71.
- Western, P. S., J. L. Harry, et al. (1999). "Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression." Dev Dyn **216**(4-5): 411-9.
- Wiater, E., K. A. Lewis, et al. (2009). "Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes." Mol Endocrinol **23**(7): 1033-42.
- Wickenheisser, J. K., V. L. Nelson-DeGrave, et al. (2006). "Human ovarian theca cells in culture." Trends Endocrinol Metab **17**(2): 65-71.
- Wilson, C. A., N. di Clemente, et al. (1993). "Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily." Mol Endocrinol **7**(2): 247-57.
- Winnier, G., M. Blessing, et al. (1995). "Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse." Genes Dev **9**(17): 2105-16.
- Wrana, J. L., L. Attisano, et al. (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." Nature **370**(6488): 341-7.
- Wu, J. W., M. Hu, et al. (2001). "Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling." Mol Cell **8**(6): 1277-89.
- Wu, X., R. Arumugam, et al. (2005). "Pubertal and adult Leydig cell function in Mullerian inhibiting substance-deficient mice." Endocrinology **146**(2): 589-95.
- Wu, X., N. Zhang, et al. (2012). "Mullerian inhibiting substance recruits ALK3 to regulate Leydig cell differentiation." Endocrinology **153**(10): 4929-37.
- Wunder, D. M., N. A. Bersinger, et al. (2008). "Statistically significant changes of antimullerian hormone and inhibin levels during the physiologic menstrual cycle in reproductive age women." Fertil Steril **89**(4): 927-33.
- Xia, Y., J. L. Babitt, et al. (2008). "Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin." Blood **111**(10): 5195-204.
- Xia, Y., V. Cortez-Retamozo, et al. (2011). "Dragon (repulsive guidance molecule b) inhibits

- IL-6 expression in macrophages." J Immunol **186**(3): 1369-76.
- Xu, L., Y. Kang, et al. (2002). "Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus." Mol Cell **10**(2): 271-82.
- Xu, M., S. L. Barrett, et al. (2009). "In vitro grown human ovarian follicles from cancer patients support oocyte growth." Hum Reprod **24**(10): 2531-40.
- Yamaguchi, S., K. Kurimoto, et al. (2009). "Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells." Development **136**(23): 4011-20.
- Yamaji, M., Y. Seki, et al. (2008). "Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice." Nat Genet **40**(8): 1016-22.
- Yamauchi, Y., J. M. Riel, et al. (2014). "Two Y genes can replace the entire Y chromosome for assisted reproduction in the mouse." Science **343**(6166): 69-72.
- Yan, C., P. Wang, et al. (2001). "Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function." Mol Endocrinol **15**(6): 854-66.
- Yang, X., C. Li, et al. (1998). "The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3667-72.
- Yeo, C. and M. Whitman (2001). "Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms." Mol Cell **7**(5): 949-57.
- Yi, S. E., A. Daluiski, et al. (2000). "The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb." Development **127**(3): 621-30.
- Yi, S. E., P. S. LaPolt, et al. (2001). "The type I BMP receptor BmprII is essential for female reproductive function." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7994-9.
- Ying, Y., X. M. Liu, et al. (2000). "Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse." Mol Endocrinol **14**(7): 1053-63.
- Ying, Y. and G. Q. Zhao (2000). "Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer, Smad1, during mouse decidualization." Biol Reprod **63**(6): 1781-6.
- Ying, Y. and G. Q. Zhao (2001). "Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse." Dev Biol **232**(2): 484-92.
- Yoon, S. H., Y. M. Choi, et al. (2013). "Association study of anti-Mullerian hormone and anti-Mullerian hormone type II receptor polymorphisms with idiopathic primary ovarian insufficiency." Hum Reprod **28**(12): 3301-5.
- Young, J. M. and A. S. McNeilly (2010). "Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle." Reproduction **140**(4): 489-504.
- Zawel, L., J. L. Dai, et al. (1998). "Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators." Mol Cell **1**(4): 611-7.
- Zhang, H. and A. Bradley (1996). "Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development." Development **122**(10): 2977-86.

- Zhang, M., Y. Q. Su, et al. (2010). "Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes." Science **330**(6002): 366-9.
- Zhao, G. Q., L. Liaw, et al. (1998). "Bone morphogenetic protein 8A plays a role in the maintenance of spermatogenesis and the integrity of the epididymis." Development **125**(6): 1103-12.
- Zhao, R., A. M. Lawler, et al. (1999). "Characterization of GDF-10 expression patterns and null mice." Dev Biol **212**(1): 68-79.
- Zhou, J., T. R. Kumar, et al. (1997). "Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary." Mol Endocrinol **11**(13): 1924-33.
- Zhu, H., P. Kavsak, et al. (1999). "A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation." Nature **400**(6745): 687-93.
- Zhu, R., X. Zhou, et al. (2010). "Aberrantly increased mRNA expression of betaglycan, an inhibin co-receptor in the ovarian tissues in women with polycystic ovary syndrome." J Obstet Gynaecol Res **36**(1): 138-46.
- Zimmermann, S., G. Steding, et al. (1999). "Targeted disruption of the *Ins13* gene causes bilateral cryptorchidism." Mol Endocrinol **13**(5): 681-91.

Résumé

L'hormone anti-Müllerienne (AMH) est un membre de la famille TGF- β impliquée dans la différenciation du tractus reproductif mâle. Elle est aussi exprimée par les cellules de la granulosa de l'ovaire adulte. Cependant, son rôle physiologique chez la femelle n'a pas encore été entièrement établi. Mon projet de thèse a pour objectif d'élucider le(s) rôle(s) de l'AMH dans le tractus reproductif femelle.

L'AMH transduit ses effets par l'intermédiaire de deux récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase : un récepteur de type II qui lui est spécifique (AMHR-II) et un récepteur de type I (ActR-IA, BMPR-IA, BMPR-IB) qu'elle partage avec les BMPs. Après fixation de l'hormone sur le récepteur de type II, celui-ci recrute et phosphoryle le récepteur de type I. Ce dernier phosphoryle à son tour les Smads spécifiques (Smad1, 5 et 8) qui s'associent à la Smad commune, Smad4. L'ensemble transloque dans le noyau et en association avec des facteurs de transcription régule les gènes cibles de l'hormone. L'utilisation de souris KO conditionnelles pour les récepteurs *Acvr1* et *Bmpr1a* et d'une technique de siRNA dirigés contre chacun des trois récepteurs de type I a permis de mettre en évidence que le récepteur BMPR-IA est un acteur essentiel de la voie de signalisation de l'AMH dans les cellules de la granulosa. Pour déterminer la ou les Smad(s) impliquées, une technique de gènes rapporteurs, Smad-Gal4/UAS-luciférase, a été utilisée. Nous avons pu montrer que les Smad1 et 5 sont importantes pour la transduction du signal de l'AMH dans les cellules de la granulosa. Récemment des corécepteurs aux BMPs, les Repulsive Guidance Molecule (RGMs), ont été mis en évidence. L'AMH partageant sa voie de signalisation avec les BMPs, nous avons cherché à déterminer si ces corécepteurs pouvaient également intervenir dans la voie de signalisation de l'AMH. Il existe 3 types de RGMs: RGMa, RGMb et RGMc. Nous avons montré en q-PCR que seul RGMb est exprimé dans les cellules de la granulosa alors que les 3 RGMs sont exprimés dans l'ovaire. L'utilisation de siRNA dirigés contre RGMb a permis de montrer que ce récepteur n'est pas nécessaire à la transduction du signal de l'AMH.

Actuellement, seuls deux gènes cibles de l'AMH sont connus dans les cellules de la granulosa : l'aromatase et le récepteur LH. Nous avons réalisé des analyses de puces à ADN (ou micro-array) pour décrire de nouveaux gènes cibles de l'AMH. L'analyse des puces a permis de décrire de nouveaux gènes régulés par cette hormone tels qu'*Ovgp1* ou *Kcnj2*.

La dernière partie de mon projet visait à déterminer un rôle potentiel de l'AMH dans l'utérus. En effet, le récepteur de cette hormone est exprimé dans le myomètre utérin permettant de supposer qu'elle peut agir sur cet organe. Nous avons pu mettre en évidence une expression faible du gène de l'*Amh* dans l'utérus. En revanche, l'expression et la localisation de la protéine restent encore à définir. Une expérience de PCR-array a permis de montrer que de nombreux gènes sont différenciellement exprimés entre l'utérus WT et l'utérus KO *Amh*. Ceci indique que l'AMH jouerait un rôle sur la régulation de la fonction utérine qu'elle soit exprimée ou non dans cet organe.